

ALTERSABHÄNGIGE MIKROGLIAAKTIVIERUNG UND PROLIFERATION NACH SCHLAGANFALL

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Robert Zünder

geboren am 19.01.1985 in Greiz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Otto W. Witte
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Harald Neumann
Center of Reconstructive Neurobiology, Universität Bonn
3. PD Dr. Ralf Claus
Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.09.2013

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ASIC	acid-sensitive ion channel
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	Bromdesoxyuridin
Cd68	cluster of differentiation 68
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglycan
DNA	deoxyribonucleic acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EEG	Elektroenzephalografie
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
GLT-1	Glutamatransporter-1
HLA-DR	human leukocyte antigen-DR
Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IFN- γ	Interferon-gamma

IGF-1	insulin-like growth factor 1
IL-1,-6,-4,-10	Interleukin-1,-6,-4,-10
K.O.	Knock Out
kbp	Kilo Basen Paare
Ki67	Antigen (Kiel, Kulturplatte 76)
LSM	Laserscanningmikroskop
MCA	middle cerebral artery
MCAO	middle cerebral atery occlusion
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MHC-2	major histocompatibility complex-2
mt-DNA	mitochondriale DNA
NDS	normal donkey serum
NeuN	neuronal nuclear antigen
NGF	nerv-growth-factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nogo-A	neurite outgrowth inhibitor-A
NT-3	Neurotrophin-3
p	P-Wert
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator

SEM	standard error of the mean
TBS	tris buffered saline
TGF- β	transforming growth factor beta
TIA	transitorisch ischämische Attacke
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TREM-2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	8
Einleitung	10
Der Schlaganfall ein Krankheitsbild von hoher sozioökonomischer Bedeutung	10
Pathophysiologie des Schlaganfalls	11
Schlaganfall und Alter, ein direkter Zusammenhang	18
Schlaganfallmodelle	20
Die Mikroglia	21
Allgemeine Charakterisierung, Aktivierung und Proliferation	21
Die duale Rolle der Mikroglia im Schlaganfall	23
Mikrogliaalterung	26
Fragestellung und Zielsetzung	28
Material und Methoden	29
Versuchstiere	29
Fokale zerebrale Ischämie durch temporäre Okklusion der A. cerebri Media	29
Reperfusion und Aufarbeitung des Gewebes	31
Immunhistochemische Färbung	31
Konfokale Laserscanningmikroskopie und Bildauswertung	33
Ergebnisse	35
Mikrogliaaktivierung mittels Iba1 Immunhistochemie	35
Mikrogliaaktivierung mittels CD68 Immunhistochemie	37
Proliferationsstudie mittels Ki67-Immunhistochemie	38
Mikrogliale Proliferationsreaktion mittels Koloalisation Iba1/Ki67	40
Diskussion	47
Zentraler Befund	47
Verminderte mikrogliale Zelldichte in der Glianarbe der alten Tiere	47
Verminderte Proliferationsreaktion der alten Tiere	50
Morphologische Alteration	53
Mögliche Auswirkung der Befunde auf das Infarktgeschehen	54
Ausblick	56
Literaturverzeichnis	58
Anhang	73

Puffer und Chemikalien.....	73
Ehrenwörtliche Erklärung	78
Danksagung	79
Lebenslauf	80

Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist ein typisches Krankheitsbild des alten Menschen. In der Todesursachenstatistik Deutschlands steht er an dritter Stelle und ist der häufigste Grund einer bleibenden Behinderung im Erwachsenenalter. Eine Vielzahl der in den letzten Jahren im Tierexperiment entwickelten neuroprotektiven Therapieansätze scheiterten an ihrer Übertragung auf den Menschen. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Verwendung mehrheitlich junger Tiere in der präklinischen Forschung. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass der Schlaganfall im hohem Lebensalter anderen Pathomechanismen folgt als in jungen Jahren. Ein Schlüsselement in der Schadenskaskade nach Schlaganfall stellen die Mikrogliazellen dar. Als Vertreter des hirneigenen Immunsystems bilden sie die größte Population im Entzündungszellpool nach Schlaganfall. Auf diesem Weg entfalten sie eine Vielzahl sowohl neuroprotektiver als auch neurotoxischer Effekte.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Unterschiede in der Mikrogliaaktivierung und Proliferation zwischen jungen und alten Individuen nach Schlaganfall aufzudecken. Dazu wurde in jungen (2 Monate) und alten (24 Monate) C57BL/6 Mäusen über das Vorschieben eines Fadens über den Abgang der A. cerebri media, welcher für 30 Minuten belassen wurde, ein striatal begrenzter Infarkt induziert. Die Hirne wurden 2 und 7 Tage nach Schlaganfall entnommen, in 40µm dicke koronare Scheiben geschnitten und anschließend immunhistochemisch mit den Markern Iba1 und CD68 für Mikroglia und Ki67 für proliferierende Zellen gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie. Dabei wurde die Zahl an Mikrogliazellen, proliferierenden Zellen und proliferierenden Mikrogliazellen in den Arealen Infarktzentrum, Infarkttrand und Periinfarktkortex erfasst. Als zentraler Befund konnte gezeigt werden, dass die alten Tiere ihren Infarktkern in Form eines ihn umgebenden Mikroglia-Randsaumes wesentlich weniger stark abgrenzen als die jüngeren Tiere. Dieser gliotische Randsaum wies bei den älteren Tieren zu beiden Zeitpunkten, 2 und 7 Tage nach Schlaganfall signifikant geringere Zelldichten an Mikroglia auf, während sich deren Zahlen im Infarktkernzentrum und im angrenzenden Kortex nicht signifikant voneinander unterschieden. Der zweite

zentrale Befund der vorliegenden Arbeit, ist eine schwächer ausgeprägte allgemeine Proliferationsreaktion der alten Tiere gegenüber den Jüngeren in der Frühphase, 2 Tage nach Schlaganfall. Hier zeigen sich in den untersuchten Arealen Infarkttrand und Periinfarktkortex deutlich geringere Zahlen an Ki67 positiven Zellen. Auch die Zahl proliferierender Mikrogliazellen war im Infarktkernrand sowie im angrenzenden Kortex zu diesem Zeitpunkt bei den alten Tieren signifikant niedriger. Im Verlauf, 7 Tage nach Schlaganfall glichen sich die Proliferationsverhältnisse zwischen Alt und Jung wieder einander an. Als eine mögliche Ursache für die gefundenen Ergebnisse wird eine beeinträchtigte Glianarbenbildung bzw. eine gestörten Interaktion zwischen Mikrogliazellen und Astrozyten im alten Hirn nach Schlaganfall diskutiert. Die Funktionen der Mikroglia sind vielfältig. In erster Linie tragen sie jedoch als hirneigene Gewebsmakrophagen, über ihre Schlüsselfunktion der Phagozytose von nekrotischen Zellen zum baldigen Wiedererlangen der Gewebshomöostase nach Hirnschädigung bei. Somit könnte die in dieser Studie gezeigte Verminderung der Mikrogliaaktivierung und Proliferation zu einer reduzierten Neuroprotektion nach Schlaganfall in den Hirnen älterer Individuen beitragen.

Einleitung

Der Schlaganfall, ein Krankheitsbild von hoher sozioökonomischer Bedeutung

Der Terminus Schlaganfall beschreibt das Vorliegen einer akuten zerebralen Durchblutungsstörung. Funktionell betrachtet, ist er in 80-85% der Fälle ischämischer und in 10-15% hämorrhagischer Natur (Poeck 2001). Die Symptomatik des akuten Schlaganfalls ist sehr vielseitig. In Abhängigkeit von der betroffenen Hirnregion können beispielsweise Lähmungen der Extremitäten, Sensibilitätsausfälle, Gesichtsfelddefekte, Sprachstörungen, Störung der räumlichen Orientierung oder neuropsychologische Defizite entstehen. Die gesamte symptomatische Bandbreite ist jedoch um einiges vielseitiger, wenn man sich vor Augen führt, dass nahezu jeder Teil des menschlichen Organismus einer zentralen Einflussnahme des Gehirns unterliegt. Die Symptome können nur vorübergehend in Erscheinung treten oder in permanenten neurologischen Ausfällen münden. Bei den Ursachen für den ischämischen Schlaganfall spielen Arteriosklerose, kardiale Embolien auf Grund von Herzrhythmusstörungen und Bluthochdruck eine entscheidende Rolle. Der Schlaganfall zählt zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland. Die Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls in Deutschland liegt etwa bei 216 je 100000 Einwohner pro Jahr und steigt mit dem Alter an (Poeck 2001, Palm et al. 2010). Der Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigt, dass Männer zu 30% häufiger betroffen sind als Frauen (Stroebele et al. 2011). Die Prognose nach Schlaganfall ist trotz sinkender Mortalitätsraten nach wie vor schlecht. In der Todesursachenstatistik belegt er mit 9,5% Platz 3 nach Herzerkrankungen und malignen Tumoren. So versterben innerhalb eines halben Jahres ca. 25% der Patienten und 66% bleiben dauerhaft behindert (Berlit 2007, Nolte 2002). Damit stellt der Schlaganfall in den Industrieländern die häufigste Ursache für eine bleibende Behinderung im Erwachsenenalter dar. Daraus ergibt sich eine enorme sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls. Die lebenslangen Behandlungskosten pro Schlaganfallpatient in Deutschland betragen durchschnittlich 43.129 Euro. Im Jahr 2004 beliefen sich die direkt medizinischen Gesamtausgaben für den Schlaganfall auf 7,1 Mrd. Euro. Davon

entfiel etwa 21% auf die stationäre Behandlung 61% auf die ambulante Versorgung und Rehabilitation und 17% auf die Krankenpflege (Kolominsky-Rabas et al. 2006). In Anbetracht des demographischen Wandels mit zunehmender Lebenserwartung wird in Zukunft zum einen die Inzidenz des Schlaganfalls steigen, zum anderen angesichts des medizinischen Fortschritts der Anteil der Patienten zunehmen, die einen akuten Schlaganfall überleben, aber dennoch dauerhaft beeinträchtigt und auf medizinische Hilfe angewiesen sind. Aus diesem Sachverhalt heraus werden für einen Zeitraum von 2006 bis 2025 direkte medizinische Kosten von 108,6 Mrd. vorhergesagt (Kolominsky-Rabas et al. 2006). Aus der Lage für den Einzelnen sowie für die gesamte Gesellschaft ergibt sich die Bedeutung und Wichtigkeit zur Erforschung der Pathophysiologie des Schlaganfalls und etwaiger Therapiestrategien gerade auf Grundlage des Alterungsaspektes.

Pathophysiologie des Schlaganfalls

Die Energiegewinnung des Gehirns erfolgt fast ausschließlich über den oxidativen Glukoseabbau. Auf Grund dessen und weil das Gehirn nur minimale Energiespeicher besitzt, ist zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels ein permanenter Nachschub von Sauerstoff und Glukose über den Blutstrom von enormer Bedeutung. Die Hirndurchblutung in Ruhe beträgt durchschnittlich 50-60ml/min/100g Hirngewebe. Bei einer Abnahme der Perfusion durch Verschluss einer Hirnarterie unter 20ml/min/100g können neurologische Ausfallerscheinungen auftreten. Diese Grenze wird als Ischämieschwelle bezeichnet. Bei weiterer Abnahme auf Werte von 8-10ml/min/100g droht der irreversible Zelltod mit Ausbildung eines nekrotischen Infarktkerns (Poeck 2001). Für das den Infarktkern umgebende Hirngewebe hat sich die Bezeichnung der „Penumbra“ herauskristallisiert. Hier kommt es nicht zum sofortigen, sondern zu einem verzögerten Zelltod, bzw. sogar einem Überleben der Neurone auf Grund des Vorhandenseins einer geringen Restperfusion bei Werten um 15-35ml/100g/min (Astrup et al.1981)(Abb.1).

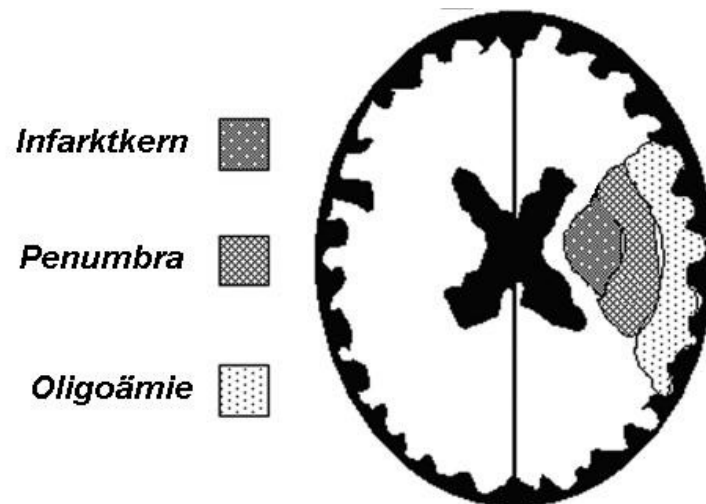


Abb. 1: Schematische Abbildung eines ischämischen Schlaganfalls im Stromgebiet der linken A. cerebri media. Entsprechend der Stärke des Perfusionsdefizits werden funktionell differierende Bereiche unterschieden: Der Infarktkern mit nahezu Erliegen der Durchblutung, die Penumbra mit kritisch eingeschränkter Restperfusion und weiter entfernte oligoämische Areale. Abb. verändert nach Bandera et al. 2006.

Das Sistieren des Blutstrom und somit der Substratzufuhr kann das Gehirn nur für eine eng begrenzte Zeitdauer verkraften. Schon nach wenigen Sekunden werden EEG-Veränderungen sichtbar, nach 10-12s tritt Bewusstlosigkeit auf und nach 3-5 min sind alle Glukosevorräte verbraucht und es kommt zu ersten Nekrosen an Nervenzellen (Poeck 2001). Nachfolgend setzt nun eine Schadenkaskade ein, die sich in die charakteristischen Phasen der Exzitotoxizität, der Perinfarktdepolarisationen, Inflammation und der Apoptose einteilen lässt (Dirnagl et al. 1999) (Abb.2). Durch den Energiemangel kommt es hierbei zu einem totalen Zusammenbruch der ATP-abhängigen Transportprozesse über die Zellmembran. Den wichtigsten Faktor stellt dabei die Na⁺/K⁺ATPase dar, die ca. 1/3 der via Blutstrom bereitgestellten Energie verbraucht (Back 1998). Durch deren Versagen kommt es zum Ausstrom von Kaliumionen und Einstrom von Natriumionen und somit zur Depolarisation der Nervenzelle. Durch den Zusammenbruch des Membranpotentials werden weitere Schadenskaskaden ausgelöst.

Ein Schlüsselmechanismus ist hierbei der durch das Versagen der Membranpumpen hervorgerufene Ca²⁺ Einstrom in die Zelle. Ca²⁺ akkumuliert intrazellulär und führt zu einer massiven Aktivierung Kalzium abhängiger Proteasen, DNAsen und Lipasen.

Der Zusammenbruch des Membranpotentials und der Ca^{2+} Einstrom führen desweiteren zu einer starken Freisetzung von Glutamat von intra- nach extrazellulär in den synaptischen Spalt. Dort bindet es an Liganden-aktivierte-Kalziumkanäle. Das Öffnen jener Kanäle führt dazu, dass nun wiederum Ca^{2+} in die Nervenzelle einströmt und das bereits bestehende Energiedefizit zusätzlich verstärkt. Dieser Kreislauf von Ca^{2+} Einstrom und Glutamatfreisetzung, der auch als Exzitotoxizität bezeichnet wird, ist damit eine der Hauptursachen für den neuronalen Zelltod nach zerebraler Ischämie. (Baosong Liu et al. 2006)

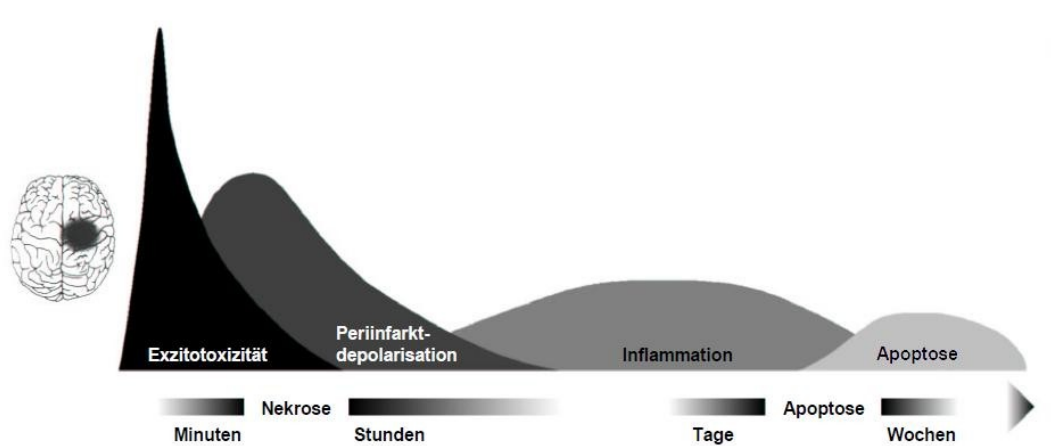


Abb. 2: Schadenskaskaden nach einer cerebralen Ischämie. aus Dirnagl et al. 1999

Begleitend zur Exzitotoxizität kommt es zu einer Übersäuerung des ischämischen Hirngewebes. Durch den Mangel an Sauerstoff kann Glukose nicht mehr aerob zu CO_2 und H_2O abgebaut werden. Stattdessen wird es anaerob zu Laktat verstoffwechselt. Dabei entsteht eine Azidose mit freien Protonen. Jene bewirken über pH-Wert abhängige Ca^{2+} Kanäle (ASICs: Acid Sensing Ion Channels) einen weiteren, von Glutamat unabhängigen, Ca^{2+} Influx (Simon 2006).

Der Infarktkern mit seinem exzitotoxischem Milieu und die hohe Konzentration an extrazellulär freigesetzten K^+ Ionen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle als Trigger für eine weitere schlaganfalltypische Erscheinung: die Periinfarktdepolarisationen. Dabei handelt es sich um periodisch wiederkehrende Depolarisationswellen, die sich von der Randzone des Infarkts ausgehend in das angrenzende Hirngewebe ausbreiten. Sie ähneln dem schon langbekannten Phänomen der Spreading

Depressions, welche auch im gesunden Hirn zu finden sind (Gorio 1986). Im Infarktkern folgt der Depolarisation keine Repolarisation. Ganz anders liegt der Fall in der Penumbra: Hier ist durch eine geringe Restperfusion noch ein gewisser Energievorrat vorhanden, der es den Zellen dort ermöglicht sich wieder zu repolarisieren. Der Wiederaufbau des Membranpotentials nach Depolarisation verschlingt aber wichtige Energiereserven, die primär zum Aufrechterhalten des Basisstoffwechsel benötigt werden. Die Folge dieses Prozesses sind somit sekundäre Zelluntergänge und eine mögliche Ausweitung des Infarktkerns in die Penumbra. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Suppression von Periinfarktdepolarisationen mittels Hypothermie oder Antagonisierung des Glutamatrezeptors eine sekundäre Infarktvergrößerung reduziert werden konnte (Fabricius et al. 2006).

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Schädigungsmechanismus ist die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffradikalen in den Mitochondrien untergehender Zellen, welcher ausgelöst wird durch hohe intrazelluläre Konzentrationen an Ca^{2+} , ADP^+ und Natrium. Im Gegensatz zu anderen Organen ist das Hirn sehr anfällig für freie Radikale, da es nur geringe Konzentrationen an endogenen antioxidativen Substanzen aufweist (Coyle und Puttfarcken 1993). Die pathologische Wirkung freier Radikale beruht auf der Zerstörung von Makromolekülen und der Förderung von Apoptose induzierenden Signaltransduktionswegen (Halliwell 2011). Oxidativer Stress beeinflusst auch die Bluthirnschranke. Über Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen werden Kollagene in der Gefäßwand lysiert, wodurch das Risiko von sekundären Einblutungen nach Reperfusion steigt (Crack und Taylor 2005).

Eine fokale Ischämie löst außerdem eine Entzündungsreaktion im Infarkt und angrenzenden Gebieten aus. Bei der Entzündungskaskade spielen verschiedene Zellarten, lösliche Mediatoren und Rezeptoren eine wichtige Rolle. In der Vergangenheit wurde der Inflammation pauschal ein negativer Einfluss auf das Outcome nach Schlaganfall unterstellt. Heute ist die Betrachtungsweise differenzierter, da man weiß, dass die Entzündungsreaktion nach Schlaganfall sowohl toxische als auch protektive Effekte zeigen kann, abhängig beispielsweise

vom Zeitpunkt nach Ischämie, der Stärke der Immunantwort oder dem Ort an dem sich dies abspielt (McCombe 2008). Als Bestandteil der zellulären Komponente wandern 12 Stunden nach Verschluss eines Hirngefäßes neutrophile Granulozyten aus dem Blutstrom in das Infarktareal ein (Gelderblom et al. 2009). Dies wird über eine Hochregulation an Integrinen und Immunglobulinen in der Endothelzelle der Gefäßwand gesteuert und zu dem erleichtert durch die Schädigung der Bluthirnschranke (Jin et al. 2010). Auf diesem Weg kommt es des öfteren zum Erliegen der Mikrozirkulation und Störung der Reperfusion durch einen Stau an neutrophilen Granulozyten im Gefäßbett. Im Infarktgewebe entfalten sie ihre Wirkung hauptsächlich durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen sowie durch Phagozytose von abgestorbenen Zellen. Im Tierexperiment konnte durch Inhibition der Neutrophilenadhäsion und Funktion eine Verkleinerung des Infarktvolumens erreicht werden (Huang et al. 2006; Chou et al. 2004). Ein anderer Vertreter der zellulären Komponente sind die Lymphozyten. Sie infiltrieren das infarzierte Gewebe innerhalb von 24 Stunden (Schroeter et al. 1994). Ihre Funktion im Schlaganfall ist noch weithin unklar. Einige Hinweise geben jedoch Untersuchungen an immundefizienten Mäuse für B und T-Lymphozyten, bei denen das kortikale Infarktvolumen gegenüber dem Wildtyp um 40% reduziert ist (Hurn et al. 2007). Einen zahlenmäßig sehr großen Anteil am Pool der Entzündungszellen bilden die Mikrogliazellen, die keine eingewanderten Fremdzellen sondern die angestammten Vertreter des hirneigenen Immunsystems darstellen (Denes et al. 2007). Dies wird jedoch erst im folgenden Kapitel ausführlicher diskutiert.

Bei der Vermittlung der Immunantwort spielen Zyto- und Chemokine als lösliche Mediatoren eine wichtige Rolle. Nach Schlaganfall werden sie von einer Vielzahl von Zellen gebildet, darunter Mikroglia, Astrozyten, Neurone und Leukozyten. Sie fungieren als Botenstoffe für die Änderung der Zellimmunoreaktivität und Morphologie, bewirken unter anderem eine Proliferation von Entzündungszellen und induzieren die Produktion von Adhäsionsmolekülen in der Gefäßwand. Die bedeutendsten Vertreter unter den Cytokinen sind IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β . Dem IL-1 wird eine überwiegend schädliche Wirkung zugeschrieben (Doyle et al 2007). Es ist beteiligt an Fieberentstehung, der Freisetzung von Arachidonsäure, Verstärkung der

NMDA vermittelten Exzitotoxizität und der Einwanderung von Leukozyten ins Infarktgebiet (Doyle et al. 2007). Nach MCAO zeigten Mäuse die mit IL-1 Rezeptorantagonisten behandelt wurden, weniger schwere neurologische Defizite und eine verminderte Gewebsnekrose (Garcia et al. 1995). Parallel zur Hochregulation von IL-1 entsteht auch TNF- α mit einem deutlichen Anstieg innerhalb der ersten 24h (Lambertsen et al. 2009). Es entfaltet proinflammatorische Effekte, ähnlich dem IL-1. Daneben ist es für die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, der Störung der Bluthirnschranke und für die Induktion anderer Zytokine verantwortlich (Doyle et al. 2007). Die Höhe des Spiegels an TNF- α im Liquor und Blut korreliert dabei deutlich mit einem schlechterem Outcome (Zaremba et al. 2001). Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin ist IL-6. Sein maximaler Spiegel im Infarktgebiet wird nach 12 Stunden erreicht, wobei dessen Höhe deutlich mit der Infarktgröße und dem Grad an Behinderung korreliert (Huang et al. 2006). Allerdings hat IL-6 auch eine gewisse antiinflammatorische Potenz, in dem es beispielsweise in der Lage ist, die Synthese des IL-1- Rezeptorantagonisten zu induzieren. Im Gegensatz zu den erstgenannten Zytokinen wirkt TGF- β weitgehend neuroprotektiv. Nach Injektion über die A. carotis führt es beispielsweise zu einem verminderten Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Infarktgebiet (Mori et al. 1992). Ebenfalls wirkt es der Glutamat vermittelten Exzitotoxizität entgegen und verbessert die endotheliale Dysfunktion (Ruocco et al 1999). Abschließend kann man festhalten, dass für die Wirkung der Entzündungsmediatoren in ihrer Gesamtheit, die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen von entscheidender Bedeutung ist.

Der Zelluntergang im Infarktkern geschieht innerhalb weniger Minuten nach Sistieren des Blutflusses durch Nekrose. Im Gegensatz dazu findet in der Penumbra, wo noch eine gewisse Restperfusion vorhanden ist, der Zelluntergang verzögert statt. Die Neurone sterben hier nicht mehrheitlich durch Nekrose sondern durch Apoptose (Beridze et al. 2001, Kerr et al. 1972). Darunter versteht man ein organisiert ablaufendes Suizidprogramm der Nervenzelle, als Reaktion auf die eigene Zellschädigung in einer pathologischen Umgebung. Triggermechanismen hierfür sind beispielsweise die Zerstörung intrazellulärer Proteine durch freie Sauerstoffradiale, DNA-Schäden, Aktivierung von Proteasen oder die Dysbalance der Ionengradienten.

Die Apoptose ist eine komplexe Kaskade, in deren Zentrum die Freisetzung von Cytochrom-C aus der Mitochondrienmembran ins Zytosol steht. Cytochrom-C aktiviert nachfolgend verschiedene Caspasen die wiederum Proteasen und DNAsen aktivieren welche die Zellstrukturen und das Genom lysieren (Horn 2003). Auf jene Signalkaskade nehmen zahlreiche pro- und antiapoptotische Faktoren Einfluss. Einer der wichtigsten antiapoptotischen Vertreter ist das Bcl-2 Protein, welches in der Lage ist das Cytochrom-C in der Mitochondrienmembran zu verankern und damit dessen Abstrom ins Zytoplasma zu verhindern. So lässt sich auch erklären, dass Pyramidenzellen der CA3 Region deutlich widerstandsfähiger gegen Ischämie sind als jene in der CA1 Region des Cortex, wo eine entsprechend geringere Immunoreaktivität für Bcl-2 festgestellt wurde (Chen et al. 1995).

Das Penumbra-Konzept ist keineswegs als statisch anzusehen sondern ist vielmehr dynamischer Art. So ist es im ungünstigsten Falle möglich, dass sich durch oben genannte Schadenskaskaden die Nekrose des Infarktkerns in die umgebende Penumbra hinaus ausbreitet (Abb. 3). Diese Entwicklung aufzuhalten, ist einer der wichtigsten Ansatzpunkte in der medizinischen Therapie des ischämischen Schlaganfalls.

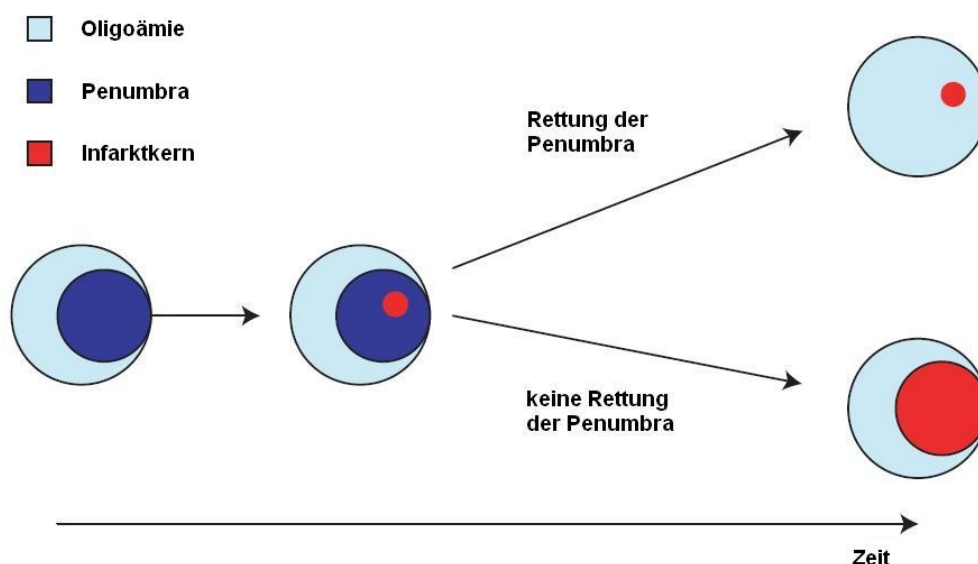


Abb. 3: Schicksal der Penumbra im Zeitverlauf. Bei Ausbleiben der Reperfusion bzw. durch sekundäre pathologische Prozesse wie Periinfarktdepolarisationen und Inflammation kann die Penumbra in den Infarktkern mit eingeschlossen werden. Abbildung modifiziert nach Ly et al. 2006

Im Mittelpunkt steht dabei das Bemühen um Wiedereröffnung der durch einen Thrombus verschlossenen Hirnarterie. Die meist eingesetzte Methode um diese Ziel zu erreichen ist die Gabe eines Fibrinolytikums, dass die Aktivierung der Protease Plasmin bewirkt, die daraufhin das Fibrinnetz spaltet, welches den Plättenthrombus zusammenhält. Entscheidend hierbei ist die frühestmögliche Gabe nach der Devise „Time is Brain“, da mit zunehmender Zeit nach Gefäßverschluss der Thrombus schwieriger zu lysieren ist, die Parenchymnekrose wächst und das Risiko reperusionsbedingter Einblutungen steigt. Die deutsche Gesellschaft für Neurologie empfiehlt deshalb den Einsatz des Fibrinolytikums rt-PA bis 4,5h bei ausgewählten Patienten (Marler et al. 2003, Hacke et al. 1999, Hacke et al. 2008). Andere Therapiekonzepte verfolgen den Weg der intraarteriellen Rekanalisation mittels Urokinase oder Alteplase (Furlan et al.1999), Ballondilatation, Thrombusaspiration (Kulcsár et al. 2010) oder Ultraschallkatheter gestützte Thrombuszerstörung (Tomsick et al. 2008) mit oder ohne nachfolgende Stentimplantation (Brekenfeld et al. 2009). Stark diskutiert ist derzeit nach wie vor das Thema der medikamentösen Neuroprotektion. Viele Therapiestrategien, die im Tiermodell eine deutliche Wirkung zeigten, scheiterten in nachfolgenden Patientenstudien (Gladstone et al. 2002). In den aktuellen Leitlinien wird deshalb keine Empfehlung für den Einsatz neuroprotektiver Substanzen bei Schlaganfall ausgesprochen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008).

Schlaganfall und Alter, ein direkter Zusammenhang

Der wichtigste Risikofaktor für den Schlaganfall ist das Lebensalter. So finden im Mittel 80% aller Schlaganfälle beim Menschen in einem Alter über 65 Jahre statt, wobei sich die Inzidenzrate nach dem 55. Lebensjahr für jedes weitere Lebensjahrzehnt nahezu verdoppelt (Rothwell et al. 2005). Sieht man diesen Umstand in Zusammenhang mit der globalen Alterung der Gesellschaft, von der man schätzt, dass sich bis zum Jahr 2050 die Zahl an Menschen über 65 Jahre nahezu verdreifacht, kommt man nicht umhin festzustellen, dass der Schlaganfall eine der

Haupt Herausforderungen für unsere Gesundheitssysteme in Zukunft sein wird (UN-World Population Prospects 2008, Anderson und Hussey 2000). Die Ursachen für das steigende Risiko mit zunehmenden Alter einen Schlaganfall zu erleiden sind vielfältig. Wichtige Risikofaktoren sind beispielsweise das Vorhandensein von Vorhofflimmern, einer Carotisstenose, sowie ganz allgemein das Vorliegen kardiovaskulärer Begleiterkrankungen und anderer Komorbiditäten wie Bluthochdruck, Hypercholesteriämie oder Diabetes mellitus, welche alle in ihrer Häufigkeit mit zunehmenden Alter steigen (Chen et al. 2010). Bei alten Menschen ist jedoch nicht nur die Schlaganfallinzidenz erhöht, sondern auch die Sterblichkeit sowie das Risiko eine bleibende Behinderung davon zu tragen. Eine Erklärung hierfür bieten verschiedene Studien an. So wird beispielsweise über einer Abnahme der Na⁺/K⁺ATPase in alternden Neuronen berichtet, wodurch Fähigkeit zur Membranstabilisierung nach zerebraler Ischämie sinkt (Scavone et al. 2005). Desweiteren zeigen beispielsweise alte Mäuse eine doppelt so hohe Dichte an GLT-1 (Glutamattransporter-1) in der weißen Substanz im Vergleich zu jungen, woraus auf eine höhere exzitotoxische Grundbelastung geschlossen wird (Baltan et al. 2008). Das Alter zeigt auch einen Einfluss auf das zerebrale Gefäßsystem, wobei die Fläche des kapillären Gefäßbetts sinkt und die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke steigt (Bertsch et al. 2009; Shah und Mooradian 1997). Auch im Tierexperiment einer zerebralen Ischämie durch Verschluss der A. cerebri media mittels Fadenvorschub (MCAO) wurden Unterschiede zwischen jungen und alten Tieren gefunden. So zeigen ältere Ratten nach MCAO in einer Studie zwar geringere Infarktvolumina aber deutlich höhere Mortalität, eine geringere Neurogenese und eine frühzeitigere Störung der Bluthirnschranke als jüngere Ratten (Jin et al. 2004; Liu et al. 2009). Dabei ist allerdings anzumerken, dass sich die Daten hinsichtlich der Infarktgröße bei alten Tieren zwischen den einzelnen Studien stark unterscheiden. So wird über größere, gleich große aber auch kleinere Infarktvolumina bei älteren Tieren gegenüber jungen berichtet (Popa-Wagner et al. 2007, Darsalia et al. 2005, Liu et al. 2009, Pecteu et al. 2008, Sieber et al. 2011). Der arterielle Mitteldruck tendiert dazu bei älteren Tieren nach MCAO zu sinken und bei jüngeren zu steigen. Interessanterweise aber ist das Auftreten von schweren Hirnödemen bei älteren

Mäusen weniger häufig vorhanden (Rosen et al. 2005). Diese macht deutlich, dass der Schlaganfall im höheren Lebensalter anderen Charakteristika folgt als in jüngeren Jahren. Demzufolge ist es nur konsequent, wenn bei präklinischen Therapieerprobungen in Zukunft auf ältere Tiere zurückgegriffen wird. Die Mehrheit der tierexperimentellen Studien in der Vergangenheit erfolgte jedoch aus Praktikabilitäts- oder Kostengründen meist an jungen Tieren. Dies könnte ein Grund darstellen, warum nahezu alle im Tierexperiment entwickelten neuroprotektiven Therapieansätze bei der Übertragung auf den Menschen scheiterten (Ginsberg 2003)

Schlaganfallmodelle

Um die der zerebralen Ischämie zu Grunde liegenden Pathomechanismen zu verstehen und um therapeutische Interventionen zu testen, wurden verschiedene Modelle, die den Schlaganfall nachahmen, entwickelt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Tierspezies und der Art der Schlaganfallinduktion. Für die Mehrheit der Studien werden derzeit Ratten und Mäuse verwendet. Die Ursache hierfür liegt in einer in Bezug auf den Mensch ähnlichen Gefäßanatomie und Hirnstruktur (Mhairi Macrae 1992), der geringen Größe, welche die Kosten für die Tierhaltung verringert und das Messen physiologischer Parameter vereinfacht (Takizawa et al. 1991), der genetischen Konstanz innerhalb eines Tierstamms, der Eignung für die Herstellung genetischer Modifikation (Chen et al. 2007) und nicht zuletzt in der Einfachheit der Durchführung reproduzierbarer Experimente (Brinker et al. 1999). Entsprechend der großen Diversität des Schlaganfalls beim Menschen, hinsichtlich Ursache, der betroffenen Hirnregion oder des Verlaufs, ist es von Nöten ein geeignetes Tiermodell zu wählen, dass die folgenden Charakteristika am besten imitiert. So ist beim Menschen der ischämische Schlaganfall durch embolischen oder atherothrombotischen Verschluss eines Hirngefäßes mit ca. 80% der Fälle deutlich häufiger als der hämorrhagische Schlaganfall. Von den großen Hirnarterien ist die A. cerebri media, als direkter Fortsatz der A. carotis in etwa 2/3 der Fälle am häufigsten betroffen (Poeck 2001). Somit haben die meisten Modelle des ischämischen Schlaganfalls als zu verschließendes Blutgefäß die A. cerebri media gemein (

MCAO, middle cerebral artery occlusion), deren Verschluss durch folgende Techniken herbeigeführt werden kann: Injektion von Fibrinthromben, photochemische Thrombose, Elektrokoagulation, chirurgisches Gefäßclipping, Gefäßligaturen, Applikation von vasokonstriktorischem Endothelin-1 oder mittels Verschieben eines Fadens intravasal über den Abgang der A. cerebri media (Graham, McCullough, und Murphy 2004). Die auch als Fadenmodell bezeichnete Version, ist die am häufigsten eingesetzte. Sie wurde 1986 von Koizumi das erste Mal beschrieben und über die Jahre mit verschiedenen Modifikationen weiterentwickelt (Belayev et al. 1996; Longa et al. 1989). Vorteile dieses Modells sind die reproduzierbaren Infarktgrößen, die bei einer Verschlusszeit von 30min in der Maus in etwa mit dem durchschnittlichen Volumen (4-15% Hemisphervolumen) des menschlichen Mediainfarktes vergleichbar ist (Carmichael 2005). Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist die Einleitung der Reperfusion durch Entfernen des Fadens, was das spontane Wiedereröffnen durch intrinsisch thrombolytische Mechanismen oder die therapeutische Rekanalisation mittels rt-Pa bei Menschen widerspiegelt. Ebenfalls entsteht bei dem 30 minütigen Fadenmodell eine deutlich ausgeprägte Penumbra, die als primäres Zielgebiet für die Erforschung neuroprotektiver Therapiestrategien gilt. Dies ist ein Vorteil gegenüber vielen anderen Schlaganfallmodellen, beispielsweise der häufig eingesetzten Photothrombose, bei der die Penumbra oft nur schwach ausgeprägt ist (Durukan und Tatlisumak 2009).

Die Mikroglia

Allgemeine Charakterisierung, Aktivierung und Proliferation

Die Mikroglia sind die Vertreter des hirneigenen, angeborenen Immunsystems und bilden mit einem Anteil von 5-15% neben den Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, einen der wichtigsten zellulären Bestandteile des ZNS (Vaughan und Peters 1974). Der Zelltyp wurde erstmals im Jahr 1921 von Rio-Hortega beschrieben (Rio-Hortega 1921). Mikrogliazellen besitzen mit ihren sehr zahlreichen, sich ständig bewegenden Fortsätzen eine stark verästelte Struktur. Auf diese Art und

Weise scannen sie kontinuierlich das gesamte Hirnparenchym auf potentielle pathologische Ereignisse, um dann im Schadensfall, als einer der ersten Abwehrmechanismen aktiv zu werden. Innerhalb kürzester Zeit migrieren sie zum Ort des Geschehens, proliferieren und durchlaufen eine charakteristische Veränderung ihrer Zellmorphologie. Die filigranen Fortsätze verkürzen und verdicken sich und der Zellkörper schwillt an um die Mikrogliazelle auf die Phagozytose vorzubereiten (Abb.4). Durch die Abräumung von nekrotischen Gewebe, mikrobiellen Keimen oder toxischen Metaboliten, sowie durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen tragen sie zum baldigen Wiedererlangen der Gewebshomöostase bei (Kreutzberg 1996). Funktionell betrachtet sind Mikroglia Makrophagen, die von Monozyten des Knochenmarks abstammen, welche in der frühen postnatalen Periode durch eine zu dieser Zeit noch offene Bluthirnschranke in das Gehirn eingewandert sind. Hier differenzierten sie sich zu einem eigenen Zelltyp, der zwar viele Gemeinsamkeiten mit peripheren Blutmakrophagen aufweist, andererseits aber auch sehr spezielle Unterschiede zeigt. So besitzen Mikrogliazellen die Fähigkeit zur Proliferation als Reaktion auf einen pathologischen Stimulus, wohin gegen ausgereifte Makrophagen des Blutes nicht mehr dazu in der Lage sind sich zu teilen (Davoust u. a. 2008). Der Eintritt in den Zellzyklus geschieht durch Stimulatoren wie IL-1, IL-4 oder IFN- γ (Kim und Vellis 2005). Das stärkste Mitogen stellt allerdings M-CSF dar, das von aktivierten Astrozyten sezerniert wird (Lee et al. 1994). Darüber hinaus sind die Mikroglia in der Lage ihre Proliferation über para- und autokrine Ausschüttung von BDNF oder NT-3 selbst zu stimulieren (Garden und Möller 2006). Sich teilende Zellen lassen sich auf verschiedene Weise immunhistochemisch darstellen. Eine oft genutzte Methode hierfür ist die intraperitoneale Applikation von BrdU, welches als Nukleosidanalogen an Stelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der S-Phase der Mitose in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. BrdU bleibt dabei für die gesamte Lebensdauer einer Zelle in ihr nachweisbar. Als Momentaufnahme der Proliferationssituation zu einem bestimmten Zeitpunkt ist also BrdU nur bedingt geeignet. Eine elegante Methode dies zu umgehen ist die Detektion sich teilender Zellen durch Antikörper, die sich gegen Zellzyklusproteine richten.

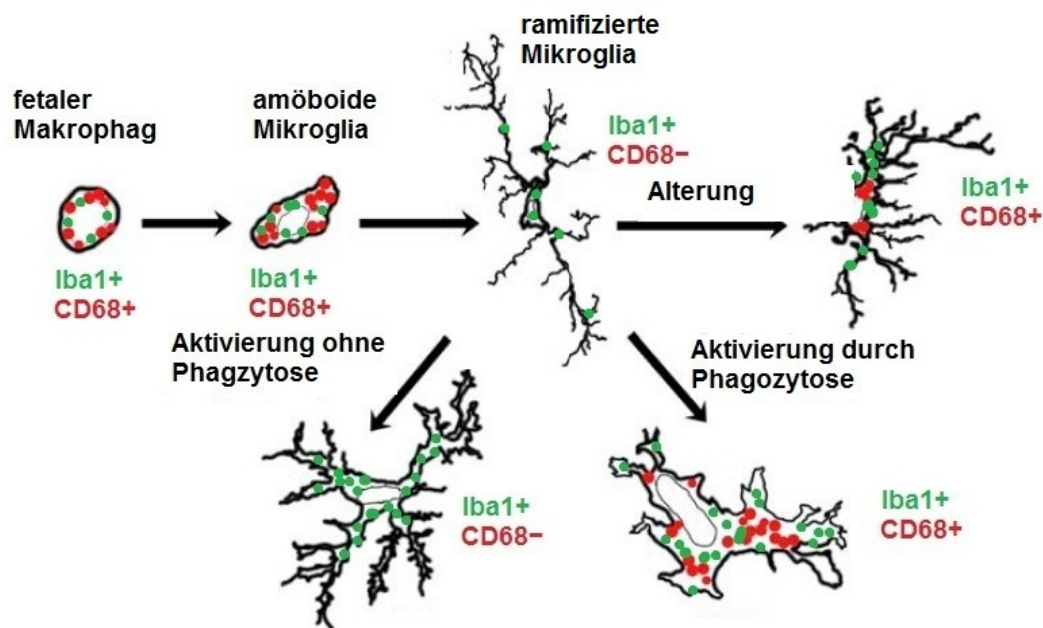


Abb. 4: Änderung von Morphologie und Immunphenotyp durch Aktivierung oder Alterung. Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) detektiert alle Entwicklungs- und Aktivierungsstadien und findet deshalb als Panmikroglia marker Verwendung (Choi et al 2007, Graeber et al 1998, Graeber und Streit 2010). Cd68 zeigt nur in Entwicklungsstadien, im hohen Alter und nach Phagozytose getriggelter Aktivierung eine positive Immunoreaktivität (Graeber et al. 1998, Perry et al. 1993). Bei ruhenden Mikrogliazellen im adoleszenten bzw. mittelalten Hirn ist es nicht nachweisbar, ebenso wenn die Aktivierung nicht mittels Phagozytose erfolgte. Die Immunoreaktivität ändert sich nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ. Nach Aktivierung steigt die Expression der Iba1- und Cd68-Antigene; veranschaulicht durch die höhere Anzahl roter und grüner Punkte nach Phagozytose. Abb. verändert nach Streit und Xue 2009

Ein solches ist das Ki-67 Antigen, das stabil während der G1-, S-, G2-, und M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird. Auf diese Art werden alle Zellen erfasst, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Mitose befinden (Scholzen und Gerdes 2000).

Die duale Rolle der Mikroglia im Schlaganfall

Nach Schlaganfall werden die Mikroglia innerhalb kürzester Zeit im Läsionsort aktiviert (Denes et al. 2007). In den ersten 3 Tagen erreicht deren Anzahl ihr Maximum um dann im Verlauf wieder abzunehmen (Jin et al. 2010). Jedoch bleiben vereinzelt reaktive Mikroglia noch sehr lange Zeit nach dem primären Ereignis im Läsionsgebiet nachweisbar (Stevens et al. 2002, Popa-Wagner et al. 2006, Gelderblom et al. 2009). Seit langem ist es ein stark diskutiertes Thema ob die

Mikroglia nach Schlaganfall eine eher neuroprotektive oder neurotoxische Rolle spielt. Es existieren viele Studien die jeweils die eine oder die andere Richtung favorisieren. Beispielsweise tragen Mikroglia über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und über die Produktion von Sauerstoffradikalen und Matrixmetalloproteinasen zu einer Infarktvergrößerung bei (Jin et al. 2010). Diese Vorgänge finden früh im Infarktgeschehen statt und fördern über die Schaffung eines inflammatorischen Milieus und dem Zusammenbruch der Bluthirnschranke die Einwanderung der deutlich toxischeren peripheren Leukozyten, allen voran der neutrophilen Granulozyten. Dass die Realität viel komplexer ist, zeigt sich am Beispiel von TNF- α . In den meisten Studien wurden hohe Konzentration von TNF- α mit größeren Infarktvolumina und schwereren neurologischen Defiziten in Verbindung gebracht und die Mikroglia und peripheren Blutmakrophagen als einer der Hauptproduzenten von TNF- α identifiziert (Barone et al. 1997, Gregersen et al. 2000). Interessant ist auch das der Ursprungsort von TNF- α eine Rolle spielt. So deutet eine Studie darauf hin, dass TNF- α , welches von der Mikroglia stammt eher neuroprotektiv wirkt während jenes von eingewanderten Leukozyten eher toxisch (Lambertsen et al. 2009). Ermöglicht wurde diese Erkenntnis durch ein Studiendesign bei dem Wild-Typ-Knochenmarksstammzellen in TNF- α -K.O-Mäuse transplantiert wurden. Darüber hinaus sind Mikroglia in der Lage via Produktion von TNF- α -p75-Rezeptoren das Zellwachstum anzuregen, was sich positiv auf das Überleben auswirken soll (Lambertsen et al. 2007; Lambertsen et al. 2009, Kraft et al. 2009). Die neuroprotektiven Eigenschaften aktivierter Mikrogliazellen entfalten sich hauptsächlich durch Phagozytose und Sekretion trophischer Faktoren. Über verschiedene Phagozytoserezeptoren können apoptotische Neurone, Myelindebris und exzitatorische Botenstoffe von der Mikrogliazelle aufgenommen werden und somit wichtige Entzündungsstimuli beseitigt werden (Jin et al. 2010, Neumann et al. 2009; Nakajima und Kohsaka 2004). Die schnelle Beseitigung von nekrotischem Gewebe ist von entscheidender Bedeutung zum Wiederaufbau der gestörten neuronalen Vernetzung. Eine Studie zeigt beispielsweise, dass nicht phagozytiertes Myelin, via Nogo-A, einem wachstumsinhibitorischen Faktor, die axonale Wiederaussprossung behindert (Schwab et al. 2004). Neue Ergebnisse

unterstreichen den neuroprotektiven Mechanismus der Phagozytose: Durch Aktivierung mittels TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), einem Phagozytose-Rezeptor an der Zelloberfläche für Myelindebris und apoptotische Zellen, kann die Mikrogliazelle dahingehend geprägt werden ihre Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu senken und die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4 oder IL-10 zu steigern (Neumann und Takahashi 2007, Turnbull et al. 2006). Desweiteren können die Mikroglia bei einwandernden neutrophilen Granulozyten deren Apoptose induzieren und diese dann nachfolgend phagozytieren, was einen kritischen Punkt bei der Begrenzung der Entzündungsreaktion darstellt (Meszaros et al. 2000; Neumann et al. 2008). Letztlich fördern Mikrogliazellen über die Freisetzung einer Vielzahl von trophischen Faktoren die Regeneration nach Schlaganfall. Ein Vertreter dieser Wachstumsfaktoren ist IGF-1 (insulin-like-growth-factor-1). Dieser schützt Oligodendrozyten vor Glutamat vermittelter Exzitotoxizität und fördert die Remyelinisierung durch Reifeinduktion von Vorläuferzellen hin zu ausdifferenzierten Oligodendrozyten (Butovsky et al. 2006; Ness und Wood 2002). BDNF(brain derived neurotrophic factor) wird ebenfalls von aktivierten Mikrogliazellen nach ZNS-Läsionen produziert und stimuliert das Wiederaussprossen von Axonen in den Läsionsrand (Batchelor et al. 2002). Einen weiteren Blick auf die Rolle der Mikroglia nach zerebraler Ischämie gewährt eine Studie von Lalancette-Hébert, dem es gelungen ist selektiv proliferierende Mikrogliazellen zu abladien, in dem er transgene Mäuse, welche die Thymidinkinase des HSV-1-Virus unter Kontrolle des CD11b-Promotors exprimieren mit Ganciclovir behandelte. Die Folge war ein signifikanter Anstieg der Infarkt volumina sowie eine nahezu dreifache Zunahme apoptotischer Zellen (Lalancette-Hébert et al. 2007). Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Mikroglia sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften nach Schlaganfall zeigen. Wichtig dabei ist die Balance der Immunantwort. Diese kann von der Einflussgröße des Alters beeinträchtigt sein kann, wie es das folgende Kapitel näher darlegt.

Mikrogliaalterung

Wie der gesamte Körper unterliegt auch das Gehirn einem unaufhaltsamen Alterungsprozess. Es hat sich herausgestellt, dass durch die Alterung des Gehirns an sich und durch die Akkumulation einer Vielzahl von pathologischen Ereignissen über die Lebensjahre, die Mikroglia einer wiederholten Aktivierung unterliegen. Diese ständigen extrinsischen Einflüsse führen zu einer Alterung der Mikroglia in Form und Funktion, was deren neuroprotektive Kapazitäten mindert und etwaige neurotoxische vermehrt (Sawada et al. 2008). Auf diese Weise steigt wiederum die Anfälligkeit des Hirns für pathologische Ereignisse, und die Mikroglia werden erneut aktiviert, was letztendlich wie ein sich selbsterhaltender Teufelskreislauf erscheint. Diese Sichtweise wird von Microarray Analysen im Menschen- und Mäusehirn gestützt. In jenen wird gezeigt, dass im Alter die Expression von Genen steigt, die mit zellulären Stress und Entzündung verbunden sind, während auf der Gegenseite die Expression neuroprotektiver und antiinflammatorischer Gene sinkt (Lee et al. 2000, Lu et al. 2004, Campuzano et al. 2009). Die Alterung der Mikroglia lässt sich auch anhand einer veränderten Morphologie und Immunophänotyps nachverfolgen. So kommt es mit zunehmenden Alter bei der Mikroglia des Menschen zu einer Rarefizierung und Verkürzung der feingliedrigen Fortsätze, einer Hypertrophie des Zytosols, und dem Einlagern des Alterspigments Lipofuscin (Conde und Streit 2006). In einer anderen Studie mit künstlich vorgealterten SMP10-Mäusen zeigten die Mikroglia ähnliche Veränderungen wie fragmentierte Fortsätze, perlschnurartige Ausstülpungen der Fortsätze und einer Abnahme des Verzweigungsgrades (Hasegawa-Ishii et al. 2011). Der Immunphenotyp der Mikroglia im Alter ist durch eine Hochregulation von Oberflächenmarkern wie ED-1, MHC-2, complement receptor 3, Il-1a oder HLA-DR bestimmt, als Ausdruck einer chronischen Aktivierung (Conde und Streit 2006). Die Mikrogliaalterung unterliegt noch weiteren wichtigen Prozessen. Ein solcher ist beispielsweise die Anhäufung von Mutation in der mitochondrialen DNA (mt-DNA) der Mikrogliazellen (Hayashi et al. 2008). Verursacht werden jene durch die relative Nähe der mt-DNA zum Produktionsort von reaktiven Sauerstoffradikalen in der Mitochondrienmembran im Rahmen der Atmungskette (Selivanov et al. 2011). In Folge sinkt durch die genetischen Veränderungen die Fähigkeit der mitochondrialen

Atmungskette zur Energiebereitstellung für Stoffwechselprozesse und andere essentielle Zellfunktionen (Nakanishi und Wu 2009). Eine Schlüsselfunktion der Mikroglia als wichtigster Vertreter der Schadensabwehr im Gehirn stellt die Phagozytose dar. Im Alter scheint die phagozytotische Kapazität der Mikroglia zu sinken (Neumann et al. 2009). So zeigte eine Studie, dass die Menge an Amyloid-Beta-Protein, welches durch die Mikroglia aufgenommen wird mit dem Alter deutlich sinkt (Njie et al. 2010). Eine uniforme Reaktion der Mikroglia auf Schaden vielfältigster Art ist deren Proliferation. Wie in anderen Körperzellen höherer Organismen, kommt es durch wiederholte Zellteilung, zu einer Kürzung der Telomere, die sich am Ende der Chromosomen in Form repetitiver DNA-Sequenzen befinden. Unterschreiten die Telomere eine kritische Länge von 4kbp wird die Apoptose induziert oder ein Wachstumsstopp tritt ein. Eine in vitro Studie bestätigt die Existenz von Telomerverkürzungen und das Eintreten einer replikatorischen Seneszenz auch bei Mikrogliazellen (Flanary und Streit 2003). Ein Folgeexperiment zeigt allerdings, dass in vivo die Mikroglia dazu in der Lage sind, ihrer Telomerverkürzung durch eine gesteigerte Telomeraseaktivität entgegen zu wirken (Flanary und Streit 2004). So ist anzunehmen, dass die robuste zahlenmäßige Proliferation als Reaktion der Mikroglia auf eine Hirnverletzung auch im Alter erhalten bleibt. In wie weit sich diese allerdings von der in jungen Tieren unterscheidet ist nach momentanem Kenntnisstand noch unklar. So berichten einige Studien über eine verfrühte und verstärkte mikrogliale Reaktion auf eine Hirnschädigung im Alter andere wiederum beschreiben sie als deutlich abgeschwächt (Petcu et al. 2008, Conode und Streit 2005, Futrell et al. 1991, Stuesse et al. 2000)

Fragestellung und Zielsetzung

Die Mikroglia als Vertreter des hirneigenen Immunsystems stellen die zahlenmäßig größte Population im Entzündungszellpool nach Schlaganfall dar (Denes et al. 2007). Sie entfalten ihre Wirkung hauptsächlich über die Abräumung von nekrotischem und apoptotischem Gewebe in ihrer Funktion als professionelle Phagozyten sowie über die Freisetzung löslicher Botenstoffe wie Entzündungsmediatoren oder Wachstumsfaktoren (Garden und Möller 2006). Dabei können sie sowohl neuroprotektiv als auch neurotoxisch wirken (Lai und Todd 2005). Alterungsprozesse der Mikrogliazelle können deren neuroprotektive Wirkung reduzieren (Conde und Streit 2006). Ebenfalls wird über veränderte Proliferationskapazitäten der Mikroglia mit steigendem Alter berichtet. Die Datenlage hierzu ist allerdings inhomogen und rar. So berichten Studien sowohl über eine erhöhte als auch erniedrigte Anzahl an Mikroglia nach ZNS-Schädigung im Alter (Conde und Streit 2006, Tanaka et al. 2006, Futrell et al. 1991, Stuesse et al. 2000).

Der Schlaganfall ist eine typische Krankheit des hohen Lebensalters, wobei 75-90% aller Schlaganfälle beim Menschen, älter als 65 Jahre, auftreten (Feigin et al. 2003). Klinische Beobachtungen zeigen, dass ältere Menschen deutlich schwerere Krankheitsverläufe und eine höhere Mortalität nach Schlaganfall aufweisen als Jüngere (Chen et al. 2010). Die Gründe hierfür sind vielfältig. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, dass im hohen Lebensalter die Anzahl der Mikroglia nach zerebraler Ischämie sowie deren Proliferationskapazität reduziert ist und dass der Verlust dieses neuroprotektiven Mechanismus eine mögliche Ursache für das schlechtere Outcome älterer Patienten nach Schlaganfall darstellen könnte.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in alten und jungen Mäusen ein Schlaganfall induziert. Anschließend wurde mittels Immunhistochemie die Anzahl an Mikrogliazellen, proliferierenden Zellen, und proliferierenden Mikrogliazellen in verschiedenen Infarktregionen bestimmt und zwischen Alt und Jung verglichen.

Material und Methoden

Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche C57BL/6 Mäuse verwendet, welche unter folgenden Bedingungen pathogenfrei gehalten wurden: ad libitum Zugang zu Wasser und Futter, 22-24° Raumtemperatur mit 68% Luftfeuchte, sowie einem 12h Tag/Nacht-Rhythmus. Die C57BL/6-Maus hat ein durchschnittliches natürliches Lebensalter von 26 Monaten (Forster et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere auf die zwei Altersgruppen 2 und 24 Monate aufgeteilt und dem entsprechend als jung und alt klassifiziert. Jede Altersgruppe enthielt acht Tiere von denen je 4 zunächst 2 Tage nach MCAO und weitere 4 nach 7 Tagen perfundiert wurden. Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Tierschutz, Bad Langensalza) und entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Fokale zerebrale Ischämie durch temporäre Okklusion der A. cerebri Media

Zur Induktion des Schlaganfalls wurde in dieser Arbeit das MCAO-Modell angewandt, welches schon von verschiedenen Autoren mit geringfügigen Änderungen beschrieben worden ist (Koizumi et al. 1986, Longa et al. 1989, Belayev et al. 1999). Die Operation wurde unter Narkose durchgeführt. Die Einleitung erfolgte in einem Zylinder mit einem Gasgemisch aus 60% Lachgas und 20% Sauerstoff, angereichert durch einen 2 – 2,5 % (V/V) Isofluranfluss. In Rückenlage wurde mit einem Hautschnitt die vordere Halsmittellinie eröffnet und die A. carotis communis, interna und externa frei präpariert. Anschließend erfolgte eine Ligatur der A. carotis externa kurz nach dem Abgang aus der A. carotis communis, um Blutungen zu verhindern. Über eine kleine Gefäßinzision in der A. carotis communis wurde nun ein Silikonfaden (0,2 mm ± 0,1 mm) entlang der A. carotis interna vorgeschoben bis zum Auftreten eines geringen Widerstandes, der anzeigte, dass

die A. cerebri anterior erreicht und somit der Abgang der rechten A. cerebri media verschlossen war (Abb. 5).

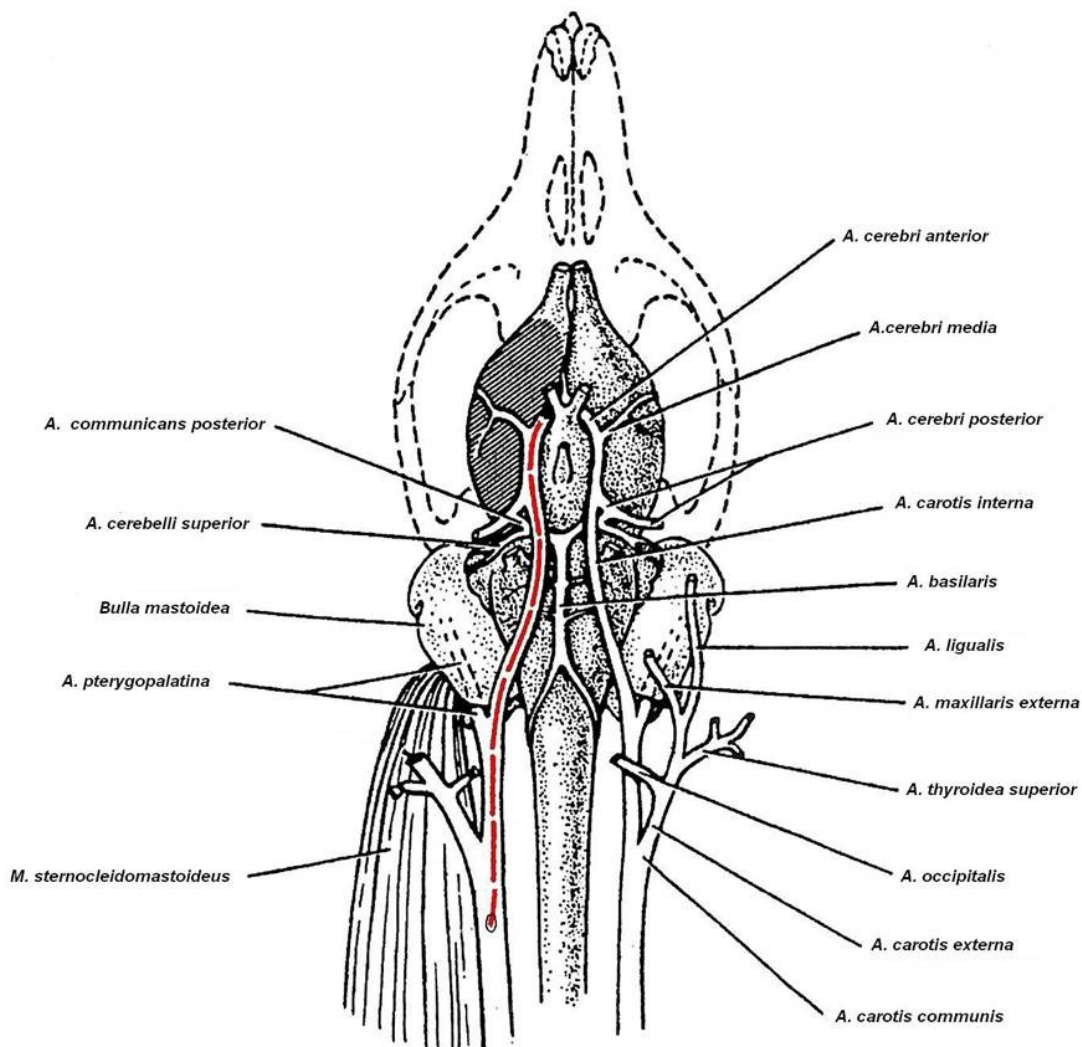


Abb. 5: Induktion eines Mediainfarkts. Über eine Inzision in der rechten A. carotis communis wird ein Faden (rot) bis über den Abgang der A. cerebri media vorgeschoben und somit eine Ischämie im Versorgungsgebiet (diagonal schraffierte Fläche) der A. cerebri media ausgelöst. Abbildung verändert nach Longa et al. 1989

Der Silikonfaden wurde für 30 Minuten belassen und nach seiner Entfernung die Reperfusion eingeleitet. Im folgenden wurde die Wunde durch Naht verschlossen und die Narkose durch Sauerstoff ausgeleitet. Bei einer Okklusionszeit von 30 Minuten entstehen mehrheitlich Infarkte, die auf das Striatum begrenzt sind (Belayev et al. 1999). Bei einem geringen Anteil der Mäuse entstand allerdings auch

eine kortikale Schädigung. Jene wurden für die folgenden Versuche ausgeschlossen.

Reperfusion und Aufarbeitung des Gewebes

Die Tiere wurden zu den Zeitpunkten 2 (n=4 je Altersgruppe) und 7 Tage (n=4 je Altersgruppe) nach Induktion der cerebralen Ischämie getötet und die Hirne entnommen. Die mittels Isofluran anästhesierte Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert und anschließend der Thorax mittels Op-Schere eröffnet. Mit Klammern wurde die Haut oberhalb der Wunde fixiert um anschließend das Herz frei zu präparieren. Nun wurde die linke Herzkammer und der rechte Vorhof eröffnet. In Ersteren wurde darauf eine Injektionsnadel eingeführt und mittels Perfusionspumpe erst 2 min mit PBS und anschließend 8 min mit 4% PFA perfundiert. Hiernach wurde die Schädeldecke eröffnet und das Gehirn entnommen und für 5 h in 4% PFA inkubiert. Zur Cryoprotektion erfolgte anschließend eine Überführung in ein Gefäß mit 30% Saccharose-Lösung so lange, bis das Hirn zu Boden gesunken war. Danach wurde das Gewebe in -30°C kaltem Methylbutan schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Mit einem Gefriermikrotom (HM400, Walldorf, Deutschland) wurde das Hirn in 40µm dicke koronare Scheiben geschnitten, die eingelegt in Anti-Freeze-Puffer, bei -20°C verwahrt wurden. Oben genannte Schritte wurden durch die Technischen Assistentinnen des Labors für experimentelle Neurologie des Universitätsklinikum Jena durchgeführt.

Immunhistochemische Färbung

Je Tier wurden 3 Schnitte in Höhe des mittleren Striatum (Bregma \pm 0,5mm) für die Färbung entnommen. Die folgende Schritte wurden im sog. Free-Floating-Verfahren durchgeführt, wobei sich die Hirnschnitte frei schwimmend in der Vertiefung einer Wellplatte bewegen können, welche auf einem Kreischüttler steht. Zunächst erfolgten 6 Waschgänge a 10min in TBS (pH=7,4) mit 0,2% Triton (TBS-T). Zur Wiederherstellung einer ursprünglichen Proteinfaltung der Epitope, die durch vorangegangene Fixationsprozesse verändert wurden, erfolgte ein Hitze-induziertes-

Antigen-Retrieval in Zitratpuffer (pH=6) für 10 min bei 95°C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte zum Block unspezifischer Bindungen für 30 min in 3% Normal-Donkey-Serum (NDS) in TBS-T übergeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern gegen CD68, Iba1 und Ki67 in entsprechender Konzentration (siehe Anhang Tab.1) in einer Lösung aus 3% NDS in TBS-T für 3 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Danach wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS-T entfernt. Nun erfolgte eine weitere Antigenblockade für 30min in TBS-T mit 3% NDS. Anschließend erfolgte die dreistündige Inkubation mit den Fluorochrom markierten sekundären Antikörpern. Alle folgenden Schritte erfolgten im Dunklen um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern. Nach 6 Waschschritten in TBS-T wurden die Schnitte für 5 min in eine DAPI-Lösung übertragen und anschließend nochmals zweimal für jeweils 5 min in TBS-T gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine 15 min Behandlung mit Kupfer(II)-sulfat in Acetatpuffer (pH=5) zur Blockade einer durch das Alterspigment Lipofuszin verursachten Autofluoreszenz, wobei vor und nach dieser Prozedur die Schnitte jeweils kurz in A. dest getaucht wurden. Danach wurde letztmalig zweimal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger erfolgte mittels Gelantine. Nach kurzem Antrocknen wurde mit Mowiol eingedeckelt.

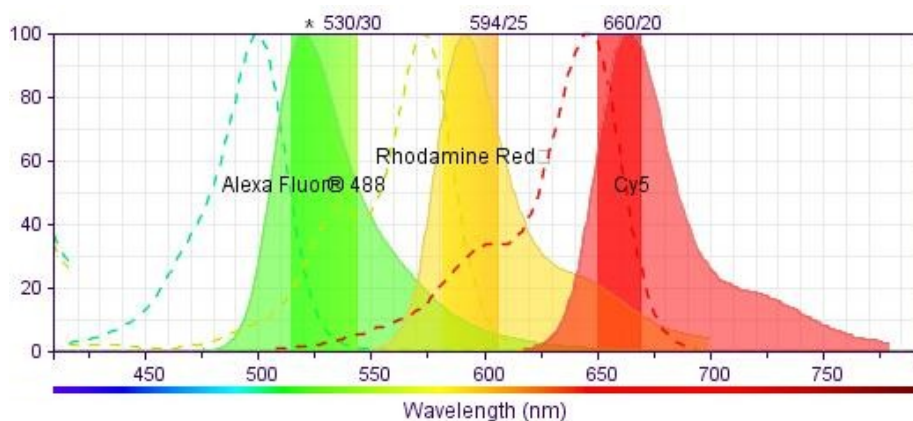


Abb. 6: Spektrale Eigenschaften der verwendeten Fluorochrome. Schematische Darstellung der Anregungs- (gestrichelte Linien) und Emissionscharakteristika (durchgezogene Linien) sowie der verwendeten Filtereinstellung (*) mit dem Ziel der überlappungsfreien Detektion aller drei Farbkanäle.

Konfokale Laserscanningmikroskopie und Bildauswertung

Aufnahme und Auswertung der Fluoreszenz gefärbten Schnitte erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 710, Carl Zeiss AG). Mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie ist es möglich mehrere horizontale Schnittbilder durch die Tiefe des Präparates zu erzeugen, welche anschließend mittels Software übereinander gelegt werden, was als Z-Stack bezeichnet wird. Diese Technik erlaubt somit eine gute räumliche Darstellung und morphologische Abgrenzung der zu untersuchenden Zellen. Die Verwendung von sekundären Antikörpern, gekoppelt mit Fluorochromen unterschiedlicher Emissionsspektren ermöglicht eine simultane Mehrfachfärbung mit verschiedenen primären Antikörpern an einem Präparat (Abb. 6). Die Aufnahmen erfolgten mit der Software ZEN (Vers. 2007, Carls Zeiss AG), Objektiv 63x/oil, Bildgröße 150µm x 150µm. Je Schnitt wurden 3 spezifische Areale ausgewertet (Abb. 7).

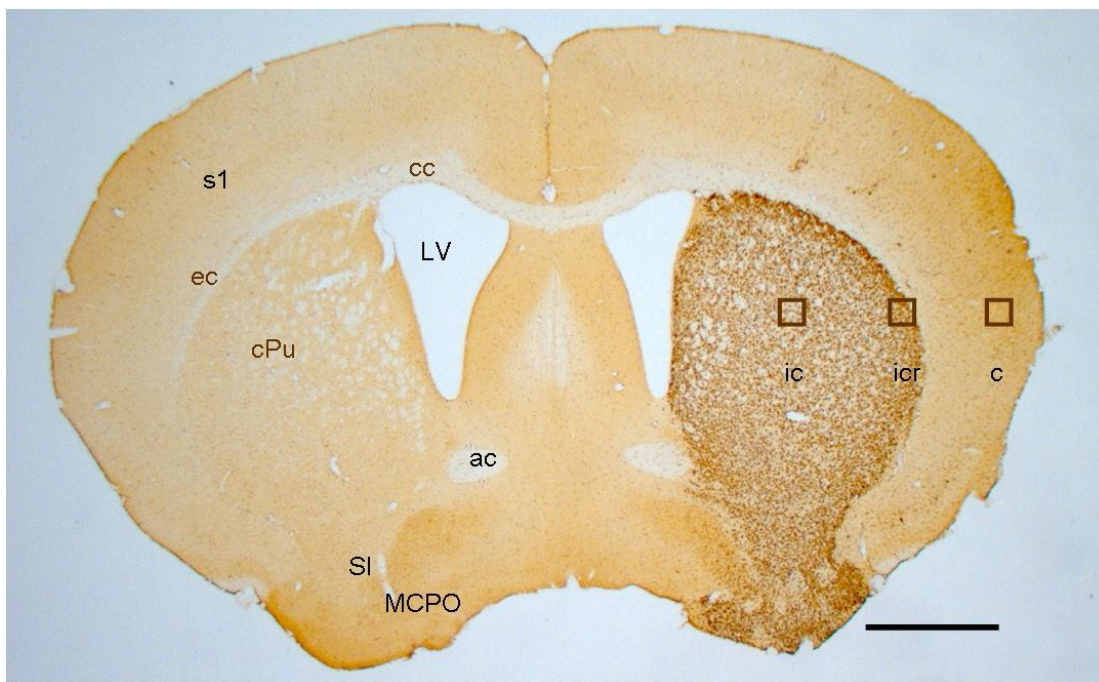


Abb. 7: Lokalisation der Zählareale. CD68 (Mikroglia) positiver, DAB gefärbter Hirnschnitt in Höhe Bregma +0,36mm für zum Zeitpunkt 7 Tage nach MCAO. Schwarze Quadrate bezeichnen die Lokalisation der 3 Zählareale: ic (Infarktzentrum), icr (Infarkttrand) c (Periinfarktkortex). Anatomische Leitstrukturen: s1 (somatosensorischer Cortex), cc (corpus callosum), LV (lateraler Ventrikel), ec (Capsula externa), cPu (Striatum), ac (Commisura anterior), SI (Substantia innominata), MCPO (Ncl. Preopticus magnocellularis). Maßbalken: 2mm

Im Z-Stack-Bild wurde die totale Anzahl an CD68 und Iba1 positiven Mikrogliazellen sowie die Gesamtzahl der Ki67 positiven proliferierenden Zellen ausgezählt. Mittels Kolokalisation von Iba1 und Ki67 wurde die Menge an proliferierenden Mikrogliazellen bestimmt. Alle Werte für die einzelnen Gruppen wurden als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen. Das statistische Signifikanzniveau wurde für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0.05$ festgesetzt. Die Datenanalyse erfolgte mittels ANOVA-Test und Tukey-HSD post hoc Test.

Ergebnisse

Mikrogliaaktivierung mittels Iba1 Immunhistochemie

Für den Mikroglia marker Iba1 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen alten und jungen Tieren zu beiden Zeitpunkten (2d, 7d) nach Schlaganfall im Gebiet des Infarkttrandes (Abb.8 und 9). Zwei Tage nach MCAO war die Zelldichte für Iba1 positive Microglia bei den alten Tieren mit 36 ± 7 Zellen je Zählareal um 31% geringer im Vergleich zu den Jungen mit $52,3 \pm 0,7$ Zellen ($p \leq 0,03$). Dieser Trend bestand weiter fort für den Zeitpunkt 7 Tage nach MCAO. Hier zeigten die alten Tiere im Infarkttrand mit $109,6 \pm 4,1$ eine um 18% geringere Zelldichte für Iba1 positive Microglia als die Jungen mit $133,5 \pm 8,1$ ($p \leq 0,01$). Dieser Befund lässt sich auch in Abb.8 und 9 optisch nachvollziehen. Es ist zusehen, dass die älteren Tiere den Infarktkern mit einem Mikroglia randsaum deutlich schwächer demarkieren. Für die anderen Zählareale, Infarktzentrum und Periinfarktkortex, ließen sich in Bezug auf die Zelldichte keine signifikanten Unterschiede zwischen alten und jungen Tieren feststellen. Bei der Analyse der zahlenmäßigen Entwicklung der Microglia innerhalb der jeweiligen Altersgruppen im zeitlichen Verlauf nach Infarkt, ließ sich sowohl bei den alten als auch bei den jungen Tieren eine deutliche Zunahme der Zellzahl Iba1 positiver Microglia vom Zeitpunkt 2 auf 7 Tage nach Schlaganfall beobachten. Diese Zunahme beschränkte sich allerdings nur auf die Gebiete des Infarktzentrums und des Infarkttrandes, während im angrenzenden Kortex keine Zunahme zu verzeichnen war. Bei den jungen Tieren stieg die Zelldichte im Infarktkern von $27,9 \pm 3,1$ 2 Tage nach MCAO auf $87,3 \pm 5,6$ 7 Tage danach ($p \leq 0,001$), was eine Zunahme von 312% bedeutet und bei den alten Tieren von $27,1 \pm 4,6$ auf $80,9 \pm 7,1$ ($p \leq 0,001$); eine Zunahme von 299%. Im Infarkttrand ist die Dynamik ähnlich: bei jungen Tieren stieg die Zelldichte von $52,3 \pm 0,7$ 2 Tage nach MCAO auf $133,5 \pm 8,1$ ($p \leq 0,001$), was einer Zunahme von 255% entsprach; bei den alten Tieren steigt sie von $36,0 \pm 7,0$ auf $109,6 \pm 4,1$ ($p \leq 0,001$), eine Zunahme von 304% (Abb. 9).

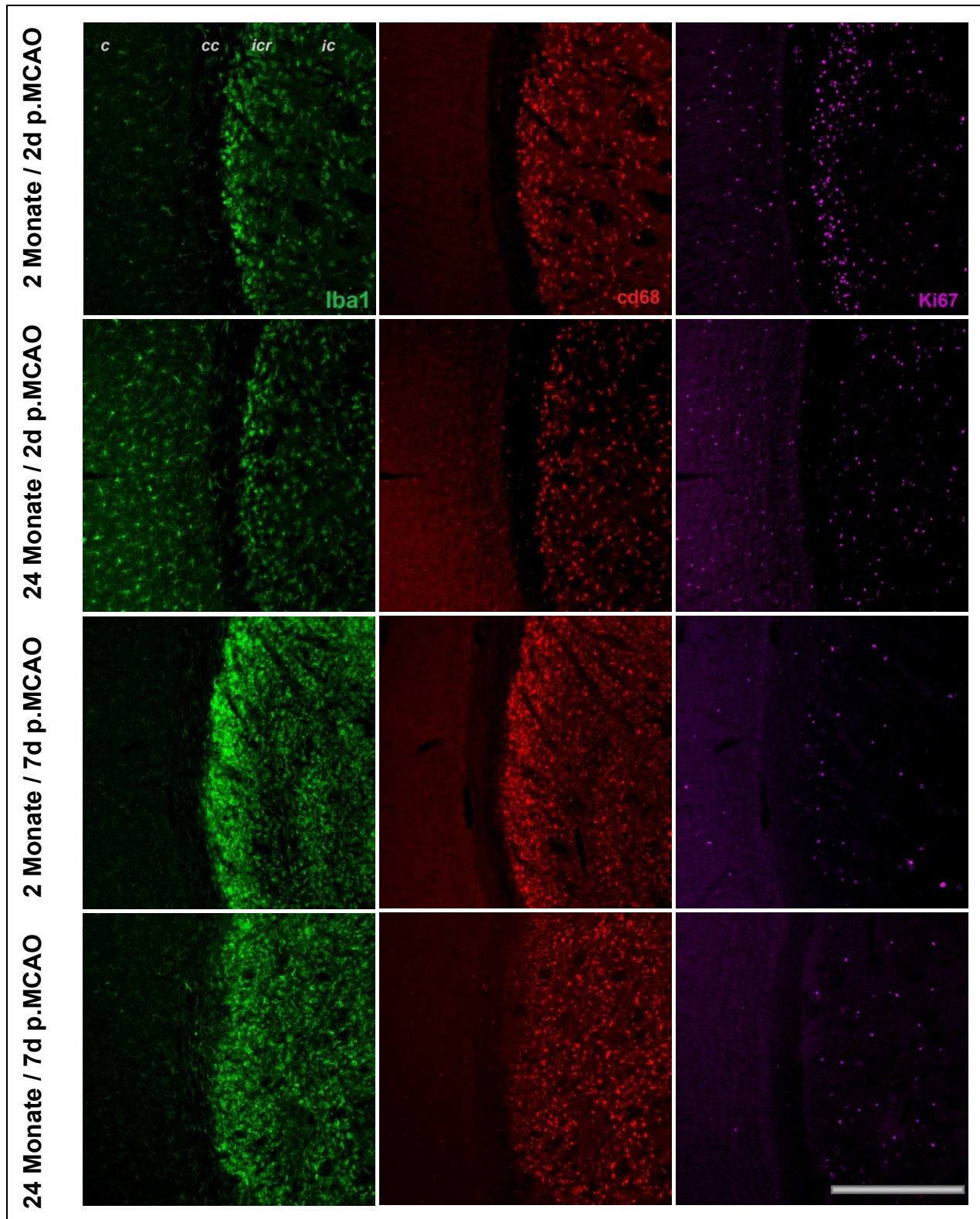


Abb. 8: Mikrogliazellen (Iba1/CD68) und proliferierende Zellen (Ki67) im Infarktgebiet in 10x Vergrößerung. Linkes oberes Bild: c (Periinfarktkortex), cc (Corpus Callosum), icr (Infarkttrand), ic (Infarktzentrum). Auffällig ist der deutlich prominentere Mikrogliaaum im Infarkttrand bei den jungen Tieren gegenüber den Alten zwei Tage und 7 Tage nach MCAO. Die Immunoreaktivität für Iba1 bei den alten Tieren im Periinfarktkortex 2 Tage nach MCAO erscheint höher als die der jungen Tiere bei etwa gleicher Zellzahl. Deutlich mehr Zellen proliferieren bei den jungen Tieren zum frühen Zeitpunkt

zwei Tage nach MCAO. Dagegen herrschen am Tag 7 nach MCAO zwischen beiden Altersgruppen nahezu ausgeglichene Proliferationsverhältnisse. Maßstabsbalken 500µm

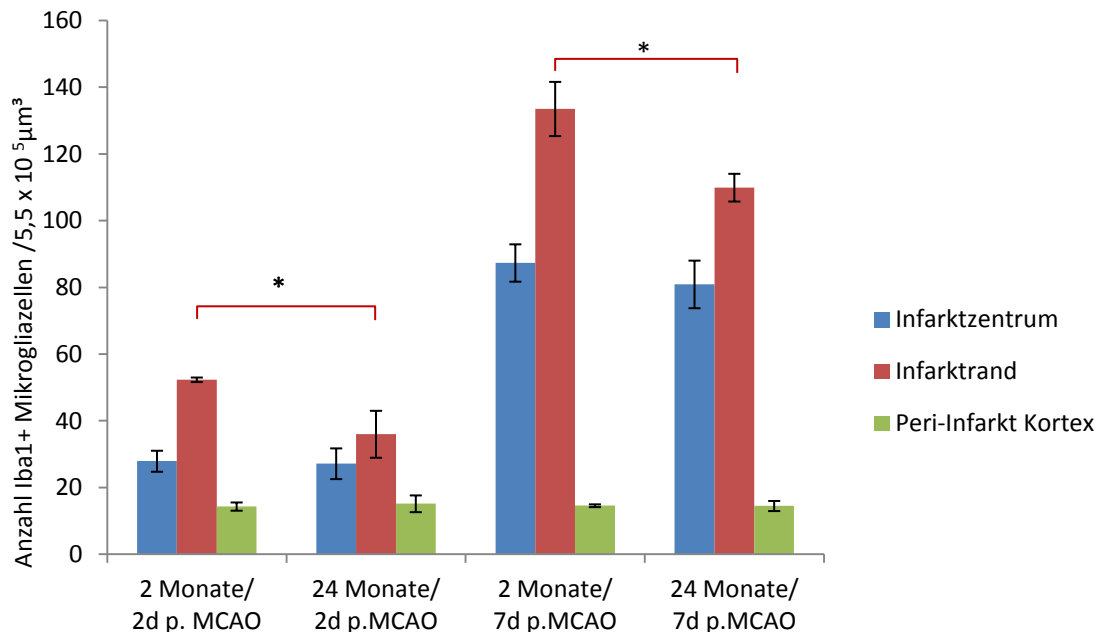


Abb. 9: Anzahl Iba1 positiver Mikroglia. Mittelwert \pm SEM der Zellzählung in den Arealen Infarktzentrum, Infarkttrand und Periinfarktkortex. Auffällig ist die verminderte Dichte an Mikrogliazellen im Infarkttrand bei den alten Tieren (24 Monate) gegenüber den jungen Tieren (2 Monate) sowohl 2 Tage als auch 7 Tage nach MCAO.* $p \leq 0,05$.

Mikrogliaaktivierung mittels CD68 Immunhistochemie

Die Auswertung für den zweiten Mikroglia marker CD68 zeigte für die Areale Infarktzentrum und Infarkttrand ähnliche Ergebnisse wie der Marker Iba1. So war auch hier der Infarkttrand bei den älteren Tieren für beide Zeitpunkte nach MCAO zellulär schwächer ausgeprägt als bei den jungen Tieren (Abb.10). Auch der Zellzuwachs an Mikrogliazellen im Infarktkern und -rand von 2 auf 7 Tage nach MCAO ist in ähnlichem Maße vorhanden wie in der Iba1-Immunhistochemie. Untersuchungen zur Kolokalisation der beiden Mikroglia marker Iba1 und CD68 zeigten ein hohes Maß an Übereinstimmung im Infarktkern und Infarkttrand. Wobei hier nahezu jede Zelle, die positiv für Iba1 war, auch ein deutlich detektierbares CD68 Signal aufwies (Abb. 13-15). Der Bindungsort für beide Antikörper in der Zelle

war jedoch unterschiedlich. Iba1 zeigte das stärkste Signal an der Zelloberfläche, was mit der überwiegenden Lokalisation seines Antigens in der Zellmembran übereinstimmt (Ohsawa et al. 2004). Demgegenüber war die Färbeintensität von CD68 am stärksten im Zytoplasma, wobei sich die Zelloberfläche und Zellfortsätze in einem schwächeren Maße ebenfalls darstellen ließen (Kurushima et al. 2000). Im Gegensatz zum Infarktkern und Infarktkernrand, zeigten die Iba1-positiven Zellen im Periinfarktkortex nahezu kein Signal für CD68 (Abb.15).

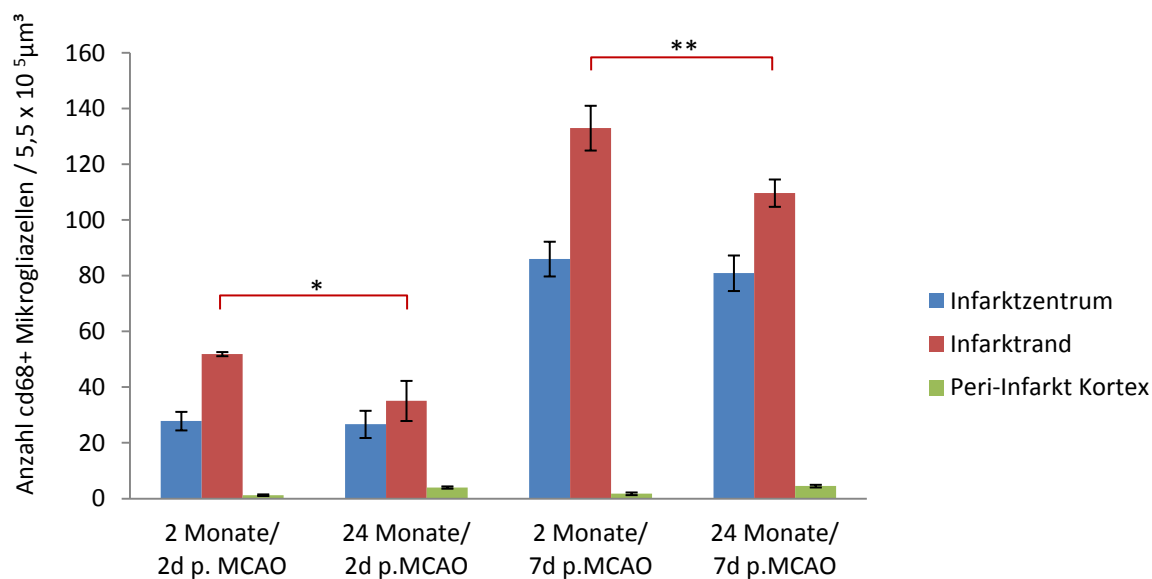


Abb. 10: Anzahl CD68 positiver Mikroglia. Mittelwert \pm SEM der Zellzählung in den Arealen Infarktzentrum, Infarktrand und Periinfarktkortex. Auffällig ist die verminderte Dichte an CD68 positiven Mikrogliazellen im Infarktrand bei den alten Tieren (24 Monate) gegenüber jungen Tieren (2 Monate) sowohl 2 Tage als auch 7 Tage nach MCAO. Die mengenmäßigen Verhältnisse CD68 positiver Mikroglia im Infarktzentrum und im Infarktkernrand entsprechen auf Grund der hohen Kolokalisationsrate annähernd den Ergebnissen der Iba1 positiven Mikroglia aus Abb.9, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Proliferationsstudie mittels Ki67-Immunhistochemie.

Sich teilende Zellen wurden in dieser Studie mittels immunhistochemischer Detektion des Zellzyklusproteins Ki67 sichtbar gemacht. Zum Zeitpunkt 2 Tage nach Schlaganfall zeigten die alten Tiere eine deutlich schwächere Proliferationsreaktion als die jungen Tiere. So war im Infarktrand die Anzahl Ki67 positiver Zellen mit $7,2 \pm 2,1$ bei den alten Tieren um 42% geringer, als bei den jungen Tieren mit Zellen $12,4 \pm 2,7$ ($p \leq 0,05$) (Abb.11). Auch im Periinfarktkortex proliferierten die alten Tiere schwächer. Hier war deren Anzahl mit $1,7 \pm 0,9$ um 70% geringer als jene der jungen

Tiere mit $5,7 \pm 0,3$ Zellen ($p \leq 0,001$). Im Infarktkern waren die Proliferationsunterschiede geringer ausgeprägt. Hier zeigten die jungen Tiere $4,5 \pm 1,5$ Ki67-positive Zellen und die alten Tiere $3 \pm 1,1$ Zellen, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Zum Zeitpunkt sieben Tage nach Schlaganfall glichen sich die Proliferationsverhältnisse in den beiden Altersgruppen aneinander an. Bei den jungen Tieren fanden sich im Infarktkern $4,9 \pm 1,6$ proliferierende Zellen, bei den Alten $5,7 \pm 2,0$, im Infarktrand bei den jungen Tieren $6,4 \pm 1,8$ und bei den Alten $5,3 \pm 2,3$ und im Periinfarktkortex bei den jungen Tieren $0,4 \pm 0,2$ und bei den alten Tieren keine proliferierenden Zellen mehr. Die Proliferationsanalyse innerhalb einer Altersgruppe zeigte bei den jungen Tieren 2 Tage nach MCAO eine tendenziell stärkere Proliferation als zu dem späteren Zeitpunkt 7 Tage nach MCAO. So fanden sich im Infarktrand 2 Tage nach Infarkt $12,4 \pm 2,7$ proliferierende Zellen und zum Zeitpunkt 7 Tage nach Infarkt $6,4 \pm 1,8$ Zellen, was nahezu einer Halbierung in diesem Areal entspricht ($p \leq 0,05$). Im Periinfarktkortex ist die Abnahme der proliferierenden Zellen noch ausgeprägter: 2 Tage nach MCAO finden sich $5,7 \pm 0,3$ Zellen und am Tag 7 nur noch $0,4 \pm 0,2$ proliferierende Zellen ($p \leq 0,001$). Für das Infarktzentrum ließ sich dieser Trend jedoch nicht beobachten. Hier war die Anzahl proliferierender Zellen zu beiden Zeitpunkten nahezu gleich: 2 Tage nach MCAO fanden sich $4,5 \pm 1,5$ Ki67 positive Zellen und am Tag 7 $4,9 \pm 1,6$ ($p = 0,992$). Die eben für die jungen Tiere dargestellte einheitliche Proliferationsdynamik für alle drei Zählareale mit hohen Zellteilungsrate im frühem Infarktgeschehen und nachfolgender Abnahme, ließ sich bei den alten Tieren nicht beobachten. So fanden sich zwischen den Zeitpunkten 2 und 7 Tage geringer ausgeprägte Unterschiede (n.s.) und darüber hinaus eine nicht einheitliche Proliferationsdynamik für die verschiedenen Zählareale.

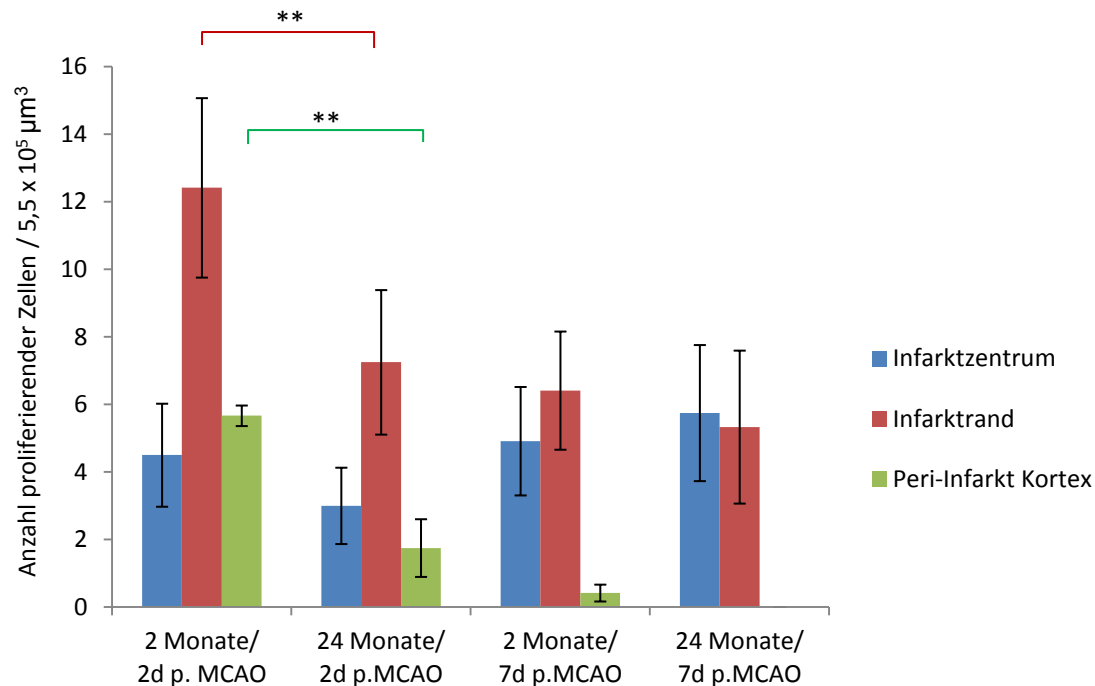


Abb. 11: Anzahl Ki67 positiver proliferierender Zellen. Mittelwert \pm SEM der Zellzählung in den Arealen Infarktzentrum, Infarkttrand und Perinfarktkortex wieder. Auffällig ist die verminderte Proliferationsreaktion der alten Tiere (24 Monate) gegenüber den jungen Tieren (2 Monate) in der Frühphase 2 Tage nach MCAO im Infarkttrand und Perinfarktkortex. Zum Tag 7 nach MCAO sind die Proliferationsverhältnisse zwischen alten und jungen Tieren nahezu gleich, geringe Unterschiede sind statistisch nicht signifikant verschieden. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$.

Mikrogliale Proliferationsreaktion mittels Kolokalisation Iba1/Ki67

Mittels Kolokalisation von Ki67 und Iba1 ist es möglich, proliferierende Mikrogliazellen zu identifizieren. Die höchste Dichte an proliferierenden Mikrogliazellen zeigte sich im Gebiet des Infarkttrandes unabhängig von der Altersgruppe und dem Zeitpunkt nach Infarkt (Abb.12). Zwei Tage nach MCAO zeigten die alten Tiere eine deutlich geringere mikrogliale Proliferation im Infarkttrand und Perinfarktkortex als die jungen Tiere. So betrug die Zahl proliferierender Mikrogliazellen im Infarkttrand bei den alten Tieren $5,4 \pm 1,9$ und ist damit nur halb so groß wie bei den jungen Tieren, wo sich $10,8 \pm 2,3$ Ki67 positive Mikrogliazellen finden ließen ($p \leq 0,01$). Im Perinfarktkortex fanden sich zwei Tage nach MCAO bei den alten Tieren mit $1,8 \pm 0,9$ nur etwa ein Drittel an Ki67 positiven Mikrogliazellen im Vergleich zu den jungen Tieren, die in dieser Region $5,4 \pm 0,4$ Zellen aufwiesen ($p \leq 0,001$). Für den Infarktkern fanden sich keine Unterschiede. Hier wiesen junge Tiere mit $2,2 \pm 0,9$ und alte Tiere mit $2,0 \pm 1,0$ etwa gleichviel proliferierende Mikrogliazellen auf. Zu dem späteren Zeitpunkt von 7 Tagen nach Schlaganfall konnten hingegen keine

Unterschiede in dem Proliferationsverhältniss zwischen Alt und Jung festgestellt werden.

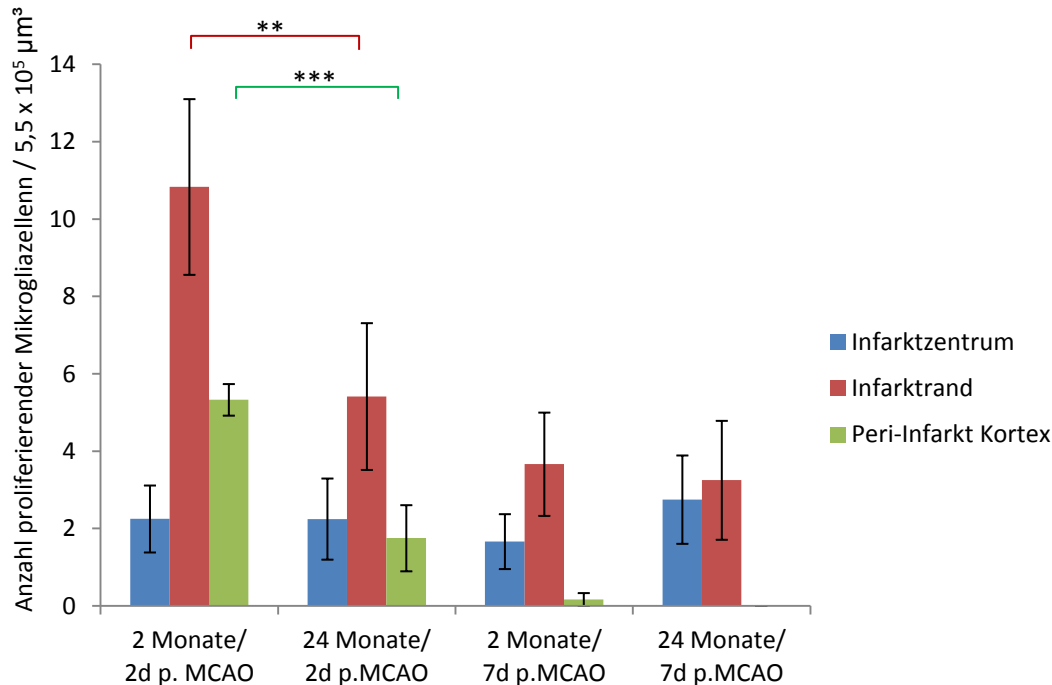


Abb. 12: Anzahl Ki67 u. Iba1 positiver proliferierender Mikroglia. Mittelwert \pm SEM der Zellzählung in den Arealen Infarktzentrum, Infarkttrand und Periinfarktkortex. Auffällig ist die verminderte Dichte an proliferierenden Mikrogliazellen der alten Tiere (24 Monate) gegenüber den jungen Tieren (2 Monate) in der Frühphase 2 Tage nach MCAO im Infarkttrand sowie im Periinfarktkortex. (Geringe Proliferationsunterschiede zwischen alten und jungen Tieren zum Zeitpunkt 7 Tage nach MCAO statistisch nicht signifikant verschieden) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

So zeigten die alten Tiere im Infarktzentrum $2,8 \pm 1,1$ proliferierende Mikrogliazellen und junge Tiere $1,7 \pm 0,7$ Zellen (n.s.). Im Infarkttrand fanden sich bei jungen Tieren bei $3,7 \pm 1,3$ und bei alten Tieren bei $3,2 \pm 1,5$ (n.s.). Im Periinfarktkortex war sieben Tage nach MCAO nahezu keine mikrogliale Proliferation mehr festzustellen (junge Tiere $0,2 \pm 0,2$, alte Tiere: 0 ± 0). Die Proliferationsanalyse im Zeitverlauf zeigte innerhalb der Gruppe der jungen Tiere eine charakteristische Dynamik mit hohen Zahlen an proliferierenden Mikrogliazellen zum frühen Zeitpunkt 2 Tage nach MCAO und im Vergleich dazu deutlich geringere Zahlen zu dem späteren Zeitpunkt 7 Tage nach MCAO: So sank die Zahl an proliferierenden Mikrogliazellen im Infarktkernrand von $10,8 \pm 2,3$ zwei Tage nach Infarkt auf $3,7 \pm 1,3$ nach 7 Tagen ($p \leq 0,001$); im Periinfarktkortex von $5,3 \pm 0,4$ 2 Tage nach Infarkt auf Zellzahl von $0,2 \pm 0,2$ 7 Tage

nach Infarkt ($p \leq 0,001$). Im Infarktzentrum fand sich eine Zahl an proliferierenden Mikrogliazellen von $2,2 \pm 0,9$ zwei Tage nach MCAO und $1,7 \pm 0,7$ sieben Tage nach MCAO ab (n.s). Alte Tiere hingegen wiesen keine mit den jungen Tieren vergleichbare Proliferationsdynamik auf. Zu beiden Zeitpunkten nach Infarkt differieren bei alten Tieren die Zahlen proliferierender Mikrogliazellen nur geringfügig und waren darüber hinaus statistisch nicht signifikant voneinander verschieden.

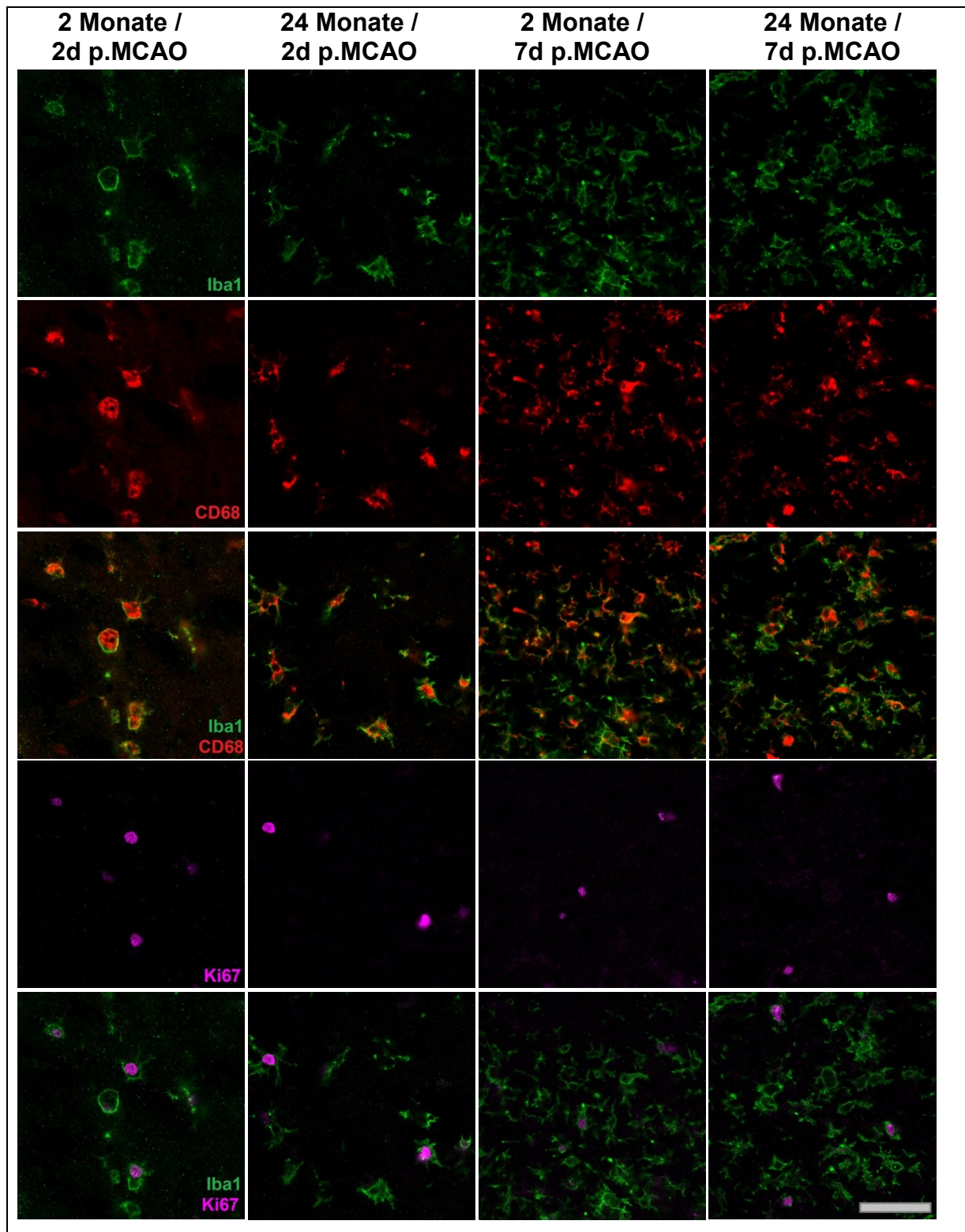


Abb. 13: Mikroglia (Iba1/Cd68) und proliferierende Zellen (Ki67) im Infarktzentrum, 63x . Auffällig ist die Zunahme der Zelldichte und die Änderung der Morphologie von runder, makrophagenartiger Mikroglia mit wenig Fortsätzen 2 Tage nach MCAO hinzu stärker ramifizierter Mikroglia 7 Tage nach MCAO. Hoher Koloalisationsgrad von Iba1 und CD68 impliziert einen reaktiven, phagozytierenden Aktivierungszustand der Mikroglia/Makrophagen. Proliferierende Zellen koloalisieren hauptsächlich mit Mikroglia/Makrophagen. Maßstabsbalken: 50µm

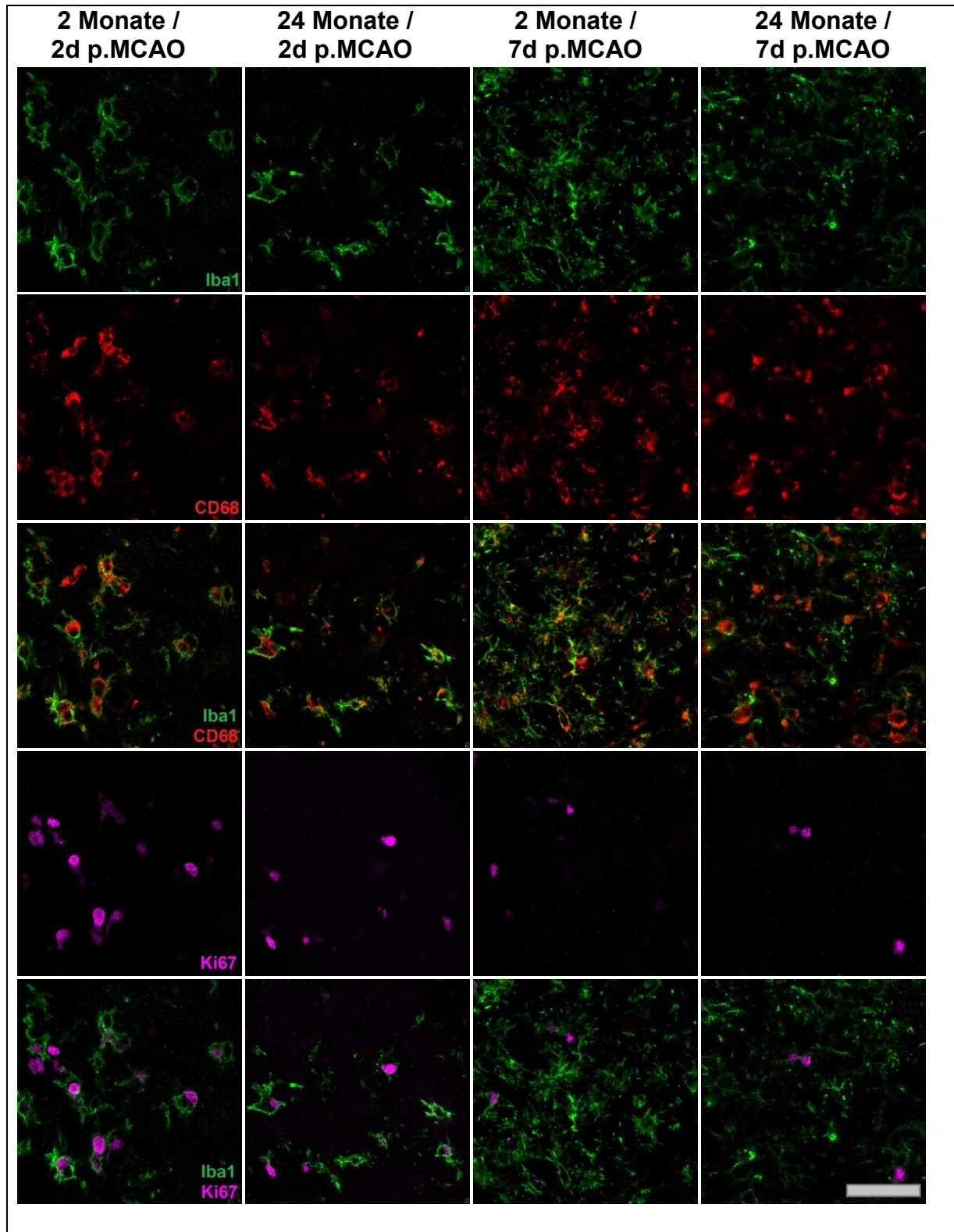


Abb. 14: Mikroglia (Iba1/CD68) und proliferierende Zellen (Ki67) im Infarkttrand, 63x. Auffällig ist die Verdichtung der Mikrogliazellen/Makrophagen vom Zeitpunkt 2 Tage auf 7 Tage nach MCAO. Die Zellkörper der Mikroglia/Makrophagen schrumpfen und der Ramifizierungsgrad nimmt deutlich zu. Deutlich erkennbare Kolokalisation von Iba1 und CD68, wobei CD68 eher auf den Zellkörper beschränkt ist, während Iba1 dagegen auch in filigranen Fortsätzen detektierbar ist, hervorgerufen durch dessen Antigenlokalisation an der Zelloberfläche. Desweiteren zeigen die jungen Tiere zum frühen Zeitpunkt 2 Tage nach MCAO deutlich mehr proliferierende Mikroglia/Makrophagen als die alten Tiere. Maßstabsbalken: 50µm

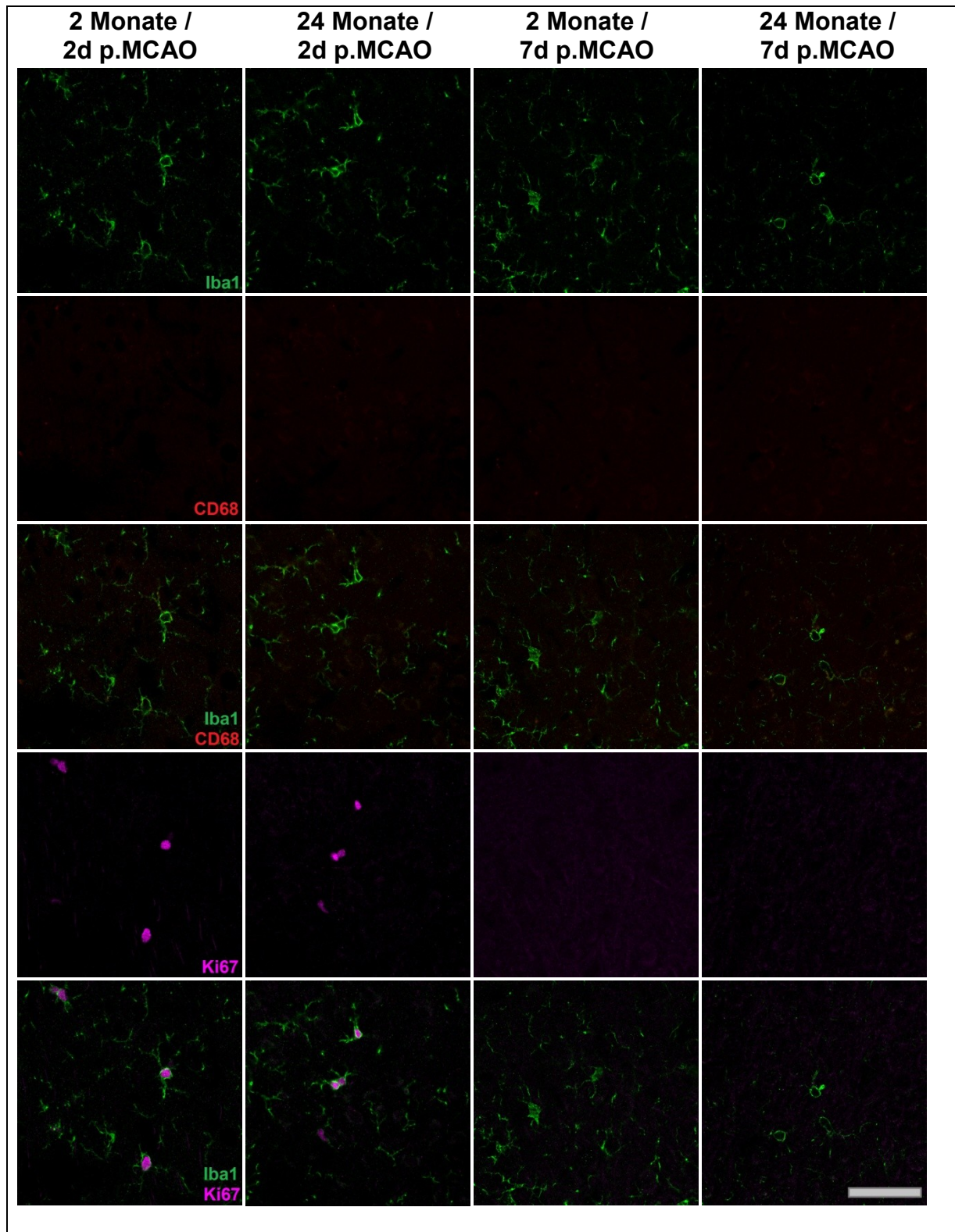


Abb. 15: Mikroglia (Iba1/Cd68) und proliferierende Zellen (Ki67) im Periinfarktkortex, 63x . Die Mikroglia/Makrophagen zeigen keine morphologische Transformation vom Zeitpunkt 2 Tage auf 7 Tage nach MCAO. Ihr Zellkörper ist klein, sie zeigen lang geschwungene, filigrane und peripher verzweigte Fortsätze. Die Dichte an Mikroglia/Makrophagen ist zu beiden Zeitpunkten nahezu gleich. CD68 ist im Periinfarktkortex zu keinem Zeitpunkt in detektierbarem Ausmaß vorhanden, was zusammen mit der Morphologie impliziert, dass die Mikroglia nicht phagozytotisch aktiv sind. Weiterhin

ist eine Proliferationsreaktion nur zum Zeitpunkt 2 Tage nach MCAO zu beobachten. Maßstabsbalken: 50µm.

Diskussion

Zentraler Befund

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Unterschiede in der Mikrogliaaktivierung und Proliferation zwischen alten und jungen Tieren nach Schlaganfall zu identifizieren. Dazu wurde in 24 und 2 Monate alten Mäusen, mittels Vorschieben eines Fadens über den Abgang der A. cerebri media, ein striatal begrenzter Infarkt induziert. Die Hirne wurden zu den Zeitpunkten 2 und 7 Tage nach Schlaganfall entnommen und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Als zentraler Befund konnte gezeigt werden, dass die alten Tiere ihren Infarktkern in Form eines ihn umgebenden Mikrogliarandsaumes wesentlich weniger stark abgrenzen, als die jüngeren Tiere. Dieser gliotische Randsaum wies bei den älteren Tieren zu beiden Zeitpunkten, 2 und 7 Tage nach Schlaganfall signifikant geringere Zelldichten an Mikroglia auf, während sich deren Zahlen im Infarktzentrum und im angrenzenden Kortex nicht voneinander unterschieden. Der zweite zentrale Befund der mit dieser Arbeit beobachtet werden konnte, ist die schwächer ausgeprägte Proliferationsreaktion der alten Tiere gegenüber den jüngeren in der Frühphase, 2 Tage nach Infarkt. Hier zeigten sich in allen drei untersuchten Arealen (Infarktzentrum, Infarkttrand, Perinfarktkortex) deutlich geringere Zahlen an Ki67 positiven Zellen. Auch die Zahl proliferierender Mikrogliazellen war im Infarkttrand sowie im angrenzenden Kortex zu diesem Zeitpunkt bei den alten Tieren signifikant niedriger. Diese Unterschiede ließen sich jedoch nur in der Frühphase 2 Tage nach Schlaganfall beobachten. Zum Zeitpunkt 7 Tage nach Schlaganfall war kein Unterschied mehr im Proliferationsverhältniss zwischen alten und jungen Tieren festzustellen.

Verminderte mikrogliale Zelldichte in der Glianarbe der alten Tiere

Eine Ursache für den schwächer ausgeprägten mikroglialen Randsaum im Bereich des Infarkttrandes bei den alten Tieren könnte vermutlich in einer veränderten Glianarbenbildung, beziehungsweise in einer beeinträchtigten Interaktion zwischen Mikroglia und Astrozyten begründet liegen. Es ist bekannt, dass das Hirn auf unterschiedlichste Schädigungen mit der Bildung einer sogenannten Glianarbe

reagiert. Die Glianarbe im Gehirn ist, wie jede andere Narbe im Körper auch, eine Art mechanischer Schutzwall, welcher ein geschädigtes Areal vom umliegenden gesunden Gewebe isoliert. Durch diese Abkapselung wird verhindert, dass sich Entzündungsprozesse, Bakterien oder nekrotisches Material auf das intakte Nachbargewebe ausbreiten können (Rolls et al. 2009). Im Gehirn besteht die Glianarbe aus einem dichten Saum an vornehmlich reaktiven Astrozyten sowie Mikrogliazellen als zellulärer Komponente und einer extrazellulären Matrix aus speziellen Glykoproteinen (Bonneh-Barkay und Wiley 2009, Carmichael et al. 2005, Rolls et al. 2009). Der Glianarbe kommt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort zu Teil. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der astrozytären Narbenbildung eine deutliche Erniedrigung der Mikroglia proliferation im Läsionsrand nach sich zieht (Rhodes et al. 2003). Somit könnte die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Mikroglia dichte bei den alten Tieren im Bereich des Infarktandes bzw. der Glianarbe durch eine mögliche Beeinträchtigung des astrozytären Beitrages an der Glianarbenbildung erklärt werden. Die extrazelluläre Matrix der Glianarbe besteht aus von Astrozyten produzierten Proteoglykanen, mit dem CSPG als einer deren wichtigsten Vertreter (Baeten et al. 2011, Bonneh-Barkay und Wiley 2009, Carmichael et al. 2005, Rolls et al. 2009). CSPG wirkt ähnlich einem Chemokin als eine Art Lockstoff, der eine Migration von Mikrogliazellen in Richtung der Glianarbe bewirkt (Nakanishi und Wu 2009). Die Unterdrückung der Formation von extrazellulärem CSPG mittels Xylosid führte in einer Studie zu einer signifikant geringeren Zahl an Mikrogliazellen in der die Läsion umgebenden Narbe (Rolls et al. 2008). Somit könnte die in unsere Arbeit gefundene reduzierte Zahl an Mikroglia im Bereich des Infarktandes bei den alten Tieren möglicherweise durch ein vermindertes Level an extrazellulärem CSPG als Folge reduzierter Astrozytenzahlen erklärt werden. Die Unterdrückung der Formation von extrazellulärem CSPG führte außerdem zu erhöhten TNF- α Spiegeln sowie zu einer reduzierten Produktion des neuroprotektiven Wachstumsfaktors IGF-1 durch die Mikroglia (Rolls et al. 2008). Dies deutet an, dass Astrozyten via CSPG nicht nur rein quantitativ die mikrogliale Migration beeinflussen sondern auch qualitativ deren Phänotyp in Richtung antiinflammatorisch/neuroprotektiv prägen können. Die Glykoproteine der extrazellulären Matrix der Glianarbe generieren über ihre

Zuckerreste ein klebriges Milieu, wodurch es zu einer Anreicherung einer Vielzahl an Botenstoffen, Metaboliten, Wachstumsfaktoren und Chemokinen kommt, die ihrerseits wiederum einen großen Migrationsanreiz für die Mikroglia darstellen, sich in den Läsionsrand zu begeben um dort zu proliferieren. Somit könnte dieser verminderte chemotaktische Anreiz ebenfalls eine potentielle Ursache für die reduzierte Zahl an Mikrogliazellen im Infarkttrand sein. Mittels Ausschüttung von Kolonie stimulierenden Faktoren wie M-CSF und GM-CSF sind Astrozyten dazu in der Lage, eine Proliferation von Mikrogliazellen in ihrer Nachbarschaft auszulösen (Giulian und Ingeman 1988, Kloss et al. 1997). Eine verminderte Ausschüttung dieser Wachstumsstimulatoren im Alter könnte somit ebenfalls zu dem schwächer ausgeprägten mikroglialen Randsaum und niedrigeren Proliferationsraten beitragen. Die Einflussnahme von Astrozyten auf die Mikroglia ist aber keineswegs unidirektional. Über die Ausschüttung von IL-1 sind die Mikroglia dazu in der Lage Astroglie zu induzieren (Amantea et al. 2010, Giulian et al. 1988). So zeigt eine Studie mit IL-1-Rezeptor-Knockout-Mäusen deutlich erniedrigte Werte für das GFAP-Protein relativ früh drei Tage nach penetrierender Hirnverletzung, während sich die Werte zwischen K.O. und Wildtyp zu späteren Zeiten wieder angleichen (Lin et al. 2006). Dies impliziert eine wichtige Bedeutung von mikroglialem IL-1 für die astrozytäre Narbenbildung gerade in der Frühphase nach Hirnverletzung. Dies ist interessant vor dem Hintergrund, dass einige Studien feststellten, dass die Aktivierung und Proliferation von Mikrogliazellen derjenigen der Astrozyten zeitlich vorausgeht (Gall et al. 1979; Vijayan und Cotman 1983). So könnte die in dieser Arbeit bei den alten Tieren beschriebene Verminderung der mikroglialen Zelldichte und Proliferation in der Frühphase des Infarkts eine Beeinträchtigung der Narbenformation zur Folge haben, was sich wiederum über die gegenseitige Einflussnahme von Mikroglia und Astrozyten in Form eines sich selbstverstärkenden Kreislaufes negativ auf die Aktivierung und Proliferation der Mikroglia auswirkt. Dieser Mechanismus könnte somit eine potentielle Erklärung für den schwächer ausgeprägten mikroglialen Randsaum im Bereich des Infarkttrandes bei den alten Tieren sein.

Verminderte Proliferationsreaktion der alten Tiere

Als zweiter zentraler Befund konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei den alten Tieren die allgemeine zelluläre Proliferation sowie auch die mikrogliale Proliferationsreaktion deutlich vermindert ist. So zeigt sich in der Frühphase, 2 Tage nach Schlaganfallinduktion, bei den alten Tieren eine im Mittel nur halb so große Zahl an Ki-67 positiven proliferierenden Mikrogliazellen als im Vergleich zu den jüngeren Tieren. Zu dem späteren Zeitpunkt 7 Tage nach Schlaganfallinduktion zeigen hingegen beide Altersgruppen nahezu gleiche Proliferationsverhältnisse. Eine Erklärung für die verminderte Proliferationskapazität der alten Tiere liegt möglicherweise in der intrinsischen Alterung der Mikroglia und deren replikativer Erschöpfung begründet. So sind die Mikroglia die einzige Zellpopulation im Gehirn, welche zu einer zahlenmäßig bedeutsamen Zellteilung in der Lage sind (Streit 2006). Nach Schädigungen verschiedenster Art werden sie innerhalb kürzester Zeit am Läsionsort aktiviert und treten in die Mitose ein. Die Aktivierungsprozesse gehen einher mit der Hypertrophie der Zellkörper, einem veränderten Oberflächenimmunophänotyp und der Produktion von zahlreichen auszuschüttenden Faktoren (Kreutzberg 1996). All diese Vorgänge sowie die Mitose an sich benötigen große Mengen an Energie, welche die Mikrogliazelle selbst generieren muss. Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Fähigkeit zur Energiegewinnung über die Atmungskette in den Mitochondrien von alternden Mikroglia beeinträchtigt ist (Hayashi et al. 2008; Nakanishi und Wu 2009; Wei et al. 2001). Dafür werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich gemacht, die durch die Mikrogliazelle bei jeder ihrer Aktivierung gebildet werden. Jene Sauerstoffspezies führen zu Schädigungen mitochondrialer DNA, welche mit wachsendem Lebensalter akkumulieren. Interessant dabei ist, dass die Dysfunktion der Mitochondrien, entstanden aus den akkumulierten DNA-Schäden, in Form eines sich selbst verstärkenden Kreislaufes, wiederum zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führt, welche ihrerseits erneut DNA-Schäden verantworten (Brown 2009). Der hier vorgestellte Mechanismus einer beeinträchtigten Energiegewinnung könnte eine mögliche Ursache für die schwächere Proliferationsreaktion von Mikrogliazellen im Alter darstellen. Eine andere denkbare Erklärung für die verminderte Proliferation ist das Auftreten von Telomerverkürzungen. Telomere sind

Sequenzen repetitiver DNA an den Enden von Chromosomen, welche sich mit jeder Zellteilung verkürzen (Mather et al. 2011). Unterschreitet die Telomerlänge einen kritischen Wert bewirkt das einen Arrest des Zellzyklus. Flanary und Kollegen berichten über das Auftreten von Telomerverkürzungen im Zellkulturexperiment nach mehreren Zyklen der Zellteilung bis hin zur replikativen Seneszenz der Mikroglia (Flanary und Streit 2003).

Experimente, die wie die vorliegende Arbeit zum Ziel haben, die mikrogliale Proliferation im alternden Gehirn quantitativ zu erfassen, existieren nur wenige. Eine Studie von Darsalia und Kollegen kommt dabei zu ähnlichen Ergebnissen wie die hier vorliegende Arbeit (Darsalia et al. 2005). Nach einstündiger MCAO in Ratten beobachteten diese weniger proliferierende Zellen im Hippocampus und Striatum bei alten Tieren. Leider erfolgte dabei keine Kolo-kalisation der Proliferationsmarker mit einem Mikroglia-marker. Eine andere Arbeitsgruppe um Conde untersuchte die Mikroglia-proliferation in Ratten im motorischen Kern des N. Fazialis nach dessen peripherer Durchtrennung (Conde und Streit 2006). Hier zeigten sich nahezu identische mikrogliale Proliferationsraten in der Frühphase zwei und drei Tage nach Verletzung zwischen jungen und alten Tieren. Zum Zeitpunkt 4 Tage war jedoch die Proliferation in den alten Tieren ausgeprägter. Dies steht gewissermaßen im Widerspruch zur vorliegenden Arbeit. Es scheinen somit im Alter wohl Läsionsmodell bedingte Unterschiede einen Einfluss auf die Stärke und den zeitlichen Verlauf der Mikroglia-aktivierung zu haben. Desweiteren existieren aber auch vom Läsionsmodell unabhängige, differierende Ergebnisse. So berichten Popa-Wagner und Kollegen von einer verstärkten mikroglialen Proliferationsreaktion bei alten Tieren nach 70 minütiger MCAO in Ratten (Popa-Wagner et al. 2007). Auffällig an dieser Studie ist, dass der Gipfel an proliferierenden (BrdU-positiven) Zellen bei den alten sowohl als auch bei den jungen Tieren zu einem deutlich späteren Zeitpunkt, nämlich 7 Tage nach Schlaganfall zu finden ist. In unserer Studie hingegen findet sich dieser Gipfel schon sehr früh im Infarktgeschehen, nämlich am Tag 2, während am Tag 7 die Proliferationsreaktion schon deutlich abgenommen hat. Eine Erklärung für diese verschiedenen Proliferationsgipfel liegt vermutlich in unterschiedlich langen Okklusionsdauern der A. cerebri media begründet. So verursacht eine 30 minütige MCAO in der Maus, wie in der vorliegenden Arbeit, einen

vornehmlich auf das Striatum begrenzten Infarkt (Denes et al. 2007, Belayev et al. 1996). Bei 70 minütiger MCAO in der Ratte kommt es hingegen neben der vollständigen Infarzierung des Striatums, auch schon zu einer partiellen kortikalen Ischämie (Lehrmann et al. 1997). Dem entsprechend findet man in der Ratte nach 70 minütiger MCAO auch zwei Penumbbras (kortikal und striatal), die ein unterschiedliches pathophysiologisches Verhalten haben (Lehrmann et al. 1997). Erschwerend für die Interpretation kommt hinzu, dass die pathophysiologischen Prozesse, allen voran die Mikrogliaaktivierung, im kortikalen Infarktgebiet zeitlich verzögerter aufzutreten scheinen, als jene im striatalen Infarktkern (Lehrmann et al. 1997). Jene Feststellung könnte eine potentielle Erklärung für den verspäteten Proliferationsgipfel darstellen. Dieser wichtige Umstand findet in den Publikationen von Popa-Wagner und Kollegen leider keine Erwähnung (Popa-Wagner et al. 2007). Neben den erhöhten mikroglialen Proliferationsraten, ist in den Studien von Popa-Wagner auch die absolute Zelldichte an Mikroglia im Infarktgebiet in den alten Tieren besonders in der Frühphase nach Schlaganfall deutlich höher als in den jungen. Darüber hinaus zeigt die Morphologie der Mikroglia in den alten Tieren zu diesem frühen Zeitpunkt bereits das Vollbild der Aktivierung, während sich das Erscheinungsbild der Mikroglia in den jungen Tieren weniger reaktiv darstellt. Dies interpretieren die Autoren als eine zu frühe und zu dem überschießende Mikrogliareaktion im alten Hirn nach Schlaganfall. Dem gegenüber zeigen unsere Ergebnisse eine signifikante Verminderung der Zelldichte an Mikrogliazellen im Infarkttrand bei den alten Tieren in der Frühphase 2 Tage nach Infarkt, als auch 7 Tage danach. Darüber hinaus ließ sich morphologisch betrachtet keine verfrühte Aktivierung der älteren Mikroglia feststellen. Eine Begründung für diese abweichenden Resultate liegt möglicherweise ebenfalls in den unterschiedlich langen Okklusionszeiten der A. cerebri media. So wurde beispielsweise nachgewiesen das längere MCAO-Zeiten und Infarktterritorien, die über das Striatum hinausgehen und den Kortex mit einbeziehen zu einer prozentualen Erhöhung des Anteils an peripheren Entzündungszellen am inflammatorischen Gesamtzellpool führt, welche nach Infarkt über die gestörte Bluthirnschranke einwandern (Denes et al 2007, Schilling et al 2003, Schilling et al. 2005, Takano et al. 2009). Von diesen Zellen lassen sich jedoch nur Lymphozyten und neutrophile Granulozyten von residenten

Mikroglia immunhistochemisch sicher abgrenzen. Blutmakrophagen hingegen teilen sich mit den hirneigenen Mikroglia einen nahezu identischen Immunophenotyp, der eine suffiziente Unterscheidung mit den herkömmlichen Methoden der immunhistochemischen Färbung nicht erlaubt (Kaneko et al. 2008). Eine Abgrenzung dieser beiden Zelltypen wird erst möglich, in dem man beispielsweise Knochenmarkszellen genetisch so verändert, dass diese ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren oder in dem man über die venöse Applikation des Farbstoffes CFSE die peripheren Blutzellen markiert (Denes et al. 2007; Kaneko et al. 2008; Schilling et al. 2003). So zeigen Studien, die sich dieser Techniken bedienen einen sichtlichen Beitrag von Blutmakrophagen zum Infarktgeschehen, auch wenn dieser jedoch dem der Mikroglia zahlenmäßig nachsteht (Schilling et al. 2003). Diese Betrachtungsweise wird erweitert durch die Feststellung, dass die Bluthirnschranke in älteren Individuen gegenüber jüngeren nach Schlaganfall eine wesentlich stärkere Aufweichung erfährt, was die Einwanderung peripherer Blutzellen in das Infarktgebiet erleichtert (Akopov et al. 1996; Farrall und Wardlaw 2009; DiNapoli et al. 2008). Somit bleibt festzuhalten, dass die Störgröße „periphere Blutmakrophagen und deren mangelnde immunhistochemische Separation von residenten Mikrogliazellen“ mit längerer MCAO-Dauer und höherem Alter deutlich an Einfluss gewinnt. Diesem Umstand wirkt die vorliegende Arbeit entgegen durch die bewusste Entscheidung für eine kürzere MCAO-Dauer von 30 min und damit einem auf das Striatum begrenztem Infarktareal.

Morphologische Alteration

Einige Autoren berichten über das Auftreten von morphologischen Veränderungen der Mikroglia mit zunehmendem Alter (Graeber 2010, Streit et al. 2004, Wasserman et al. 2008). So beschreiben Streit und Kollegen ein spezielles Erscheinungsbild der Mikroglia im Gehirn alter Menschen, was sie als dystrophisch bezeichnen (Streit et al. 2004, Streit et al. 2009). Darunter verstehen sie abnorme Zytoplasmaformationen wie deramifizierte, fragmentierte, oder ungewöhnlich gewundene Fortsätze mit kugelförmigen spheroidalen Schwellungen an deren Ende sowie atrophische aber auch hypertrophe Zellkörper. In der vorliegenden Studie, konnten jedoch keine der voran beschriebenen morphologischen Veränderungen in den Hirnen alter Tiere

festgestellt werden. Dies ist jedoch wenig verwunderlich. Zum einen sind die beschriebenen Veränderungen unspezifisch, da ähnliche Erscheinungen auch bei aktivierten Makrophagen beobachtet werden können, was die Unterscheidung zwischen dystroph oder aktiviert erschwert, zum anderen stammen jene Beobachtungen fast ausschließlich vom Menschenhirn. Hier ist der Zeitraum, in dem äußere Einflüsse oder sich anhäufende neurodegenerative Krankheiten eine morphologische Transformation der Mikroglia herbeiführen können ein viel längerer als in Nagetieren, wo die natürliche Lebenserwartung beispielsweise der Ratte kaum mehr als 3 Jahre beträgt.

Mögliche Auswirkung der Befunde auf das Infarktgeschehen

Nach Schlaganfall zeigt sich im Hirn alter Mäuse eine deutlich geringe Dichte an Mikrogliazellen im Bereich der Infarktnarbe. Die Ursache hierfür wurde in einer veränderten Interaktion zwischen Mikroglia und Astrozyten angenommen. Auch zeigte sich eine deutlich verminderte Proliferationsreaktion der Mikrogliazellen im älteren Hirn. Dies wurde zurückgeführt auf eine mögliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Energiegewinnung bzw. auf das Auftreten von Telomerverkürzungen.

Nach vorangegangener Darstellung und Diskussion potentieller Ursachen für die gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit, wird im folgenden auf deren mögliche Folgen eingegangen. Bis zum heutigen Tag existieren unzählige Veröffentlichungen, die auf der einen Seite jeweils die toxischen Eigenschaften der Mikroglia, auf der anderen Seite deren protektive Eigenschaften betonen. Gerade beim Schlaganfall fällt dies besonders auf. Während einige Autoren die Mikroglia „verteufelten“, priesen andere sie wiederum als „heilige Samariter“ (Wood 1995, Kreutzberg 1996, Stoll et al. 1998, Lees 1993). Heute ist die Betrachtungsweise der Mikroglia differenzierter und weniger dogmatischer als die „Schwarzweißmalerei“ der Vergangenheit. Man ist sich einig darüber, dass protektive und toxische Eigenschaften simultan in der Mikrogliazelle agieren. Welche Seite überwiegt, ist dabei von vielen Faktoren abhängig, beispielsweise von Zeit, Ort, oder Stärke der Mikroglia Aktivierung, dem Typ der ZNS-Pathologie (chronisch degenerativ vs. akut) oder dem Alter des

betroffenen Individuums (Sawada et al. 2008; Kriz 2006; Ekdahl et al. 2009; Graber und Dhib-Jalbut 2009). Die Funktionen der Mikroglia sind überaus vielfältig. Sie stellen den ersten Abwehrmechanismus nach Hirnschädigungen dar, übernehmen aber auch Aufgaben unter physiologischen Bedingungen, wie der Hirnentwicklung. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, sind beteiligt an der Synaptogenese oder können über ihre Oberflächenrezeptoren Apoptose induzieren (Graeber 2010). Nichts desto trotz sind die Mikroglia in erster Linie jedoch Makrophagen, was bedeutet das ihre Kernkompetenz in der Phagozytose liegt (Neumann et al. 2009). Nach Verschluss einer hirnversorgenden Arterie bildet sich binnen kurzer Zeit ein nekrotischer Infarktkern. Dieser Kern ist ein Entzündungsstimulus par excellence. Sich von ihm auf das Nachbargewebe ausbreitende Entzündungsprozesse und das entstehende exzitotoxische Milieu sind einer der Hauptauslöser für den sekundären Tod weiterer Nervenzellen durch Apoptose (Dirnagl et al. 1999). Somit ist es sinnvoll, dass der Infarktkern durch die Glianarbe frühzeitig von gesundem Gewebe abgekapselt wird und die Mikroglia über die Phagozytose der Nekrose den Entzündungsstimulus beseitigt (Neumann et al. 2009). Je früher und schneller diese „Reinigung“ von statten geht desto besser. Nun zeigt diese Arbeit jedoch bei den älteren Tieren eine verminderte mikrogliale Zelldichte im Bereich der Glianarbe sowie eine eingeschränkte Proliferationsreaktion gerade in der so wichtigen Frühphase nach Infarkt. Unabhängig von der geringeren Zahl an Mikroglia, scheint darüber hinaus deren Fähigkeit zur Phagozytose im höheren Alter auch qualitativ beeinträchtigt zu sein (Neumann et al. 2009). So berichten Zhao und Kollegen über die verminderte Phagozytoseleistung von Mikroglia in alten Ratten nach Toxin vermittelter Demyelinisation (Zhao et al. 2006). Zusammengefasst deuten all diese Ergebnisse daraufhin, dass im höheren Lebensalter die neuroprotektive Funktion der Mikroglia nach Schlaganfall zum einen durch deren verminderte Anzahl und zum anderen durch intrinsische Alterungsprozesse beeinträchtigt ist. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die höhere Mortalität und die schlechtere Genesung älterer Menschen nach Schlagfall darstellen.

Ausblick

Aus den Resultaten dieser Arbeit ergeben sich Fragen, die die Grundlage für zukünftige Forschungsarbeiten darstellen könnten. Ein zentraler Befund der vorliegenden Studie ist der weniger dicht ausgeprägte Mikroglia-Andsaum um den Infarktkern alter Tieren. Die Ursache dafür wurde in einer veränderten Interaktion zwischen Mikroglia und Astrozyten sowie in einer beeinträchtigten Glianarbenbildung angenommen. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Aktivierung und Proliferation der Mikroglia lag, sollte in einer Folgestudie auch der astrozytäre Beitrag untersucht werden. Dabei könnte man ähnlich wie in dieser Studie die Dichte und Proliferation astrozytärer Zellen in der Glianarbe bestimmen und diese mit der der Mikroglia korrelieren. Erweitert werden sollte das Ganze um eine Analyse der Expression extrazellulärer Matrixproteine in der Glianarbe durch Immunhistochemie und Westernblot. Auf RNA-Ebene wäre zu dem die Bestimmung der mikroglialen und astrozytären Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, M-CSF und IL-1 sinnvoll, um herauszufinden in wie weit die gegenseitige Proliferationsinduktion verändert ist.

Im zweiten Teil der Diskussion wurde auf teils widersprüchliche Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen hinsichtlich der Mikroglia-proliferation und Zelldichte nach Infarkt eingegangen. Als Ursache für die divergierenden Ergebnisse wurde der Einfluss verschieden langer Verschlusszeiten der MCA diskutiert. Längere Verschlusszeiten führen über eine größere Schädigung der Bluthirnschranke zu einen verstärkten Einstrom von peripheren Blutzellen in das Infarktgebiet, von denen besonders Blutmakrophagen immunhistochemisch schwer von residenten Mikrogliazellen abgrenzbar sind. Somit wäre es in Folgeexperimenten angezeigt bei alten Tieren den Einstrom der Leukozyten in das Infarktgebiet, über deren vorherige Markierung mittels CFSE oder GFP in Abhängigkeit von der MCAO-Dauer quantitativ zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit, wie auch viele andere, versucht sich hauptsächlich an der quantitativen Erfassung der Mikroglia-reaktion. Obwohl die Literatur dazu tendiert der Mikroglia vor allem bei akuten ZNS-Pathologien eine eher protektive Wirkung zu unterstellen, kann man jedoch aus verminderten oder erhöhten Zahlen an Mikroglia nur bedingt auf deren qualitativen Gesamtbeitrag am Infarktgeschehen schließen. So wird es eine Kernaufgabe für die Zukunft sein, verlässliche Marker zu finden, an

Hand derer man eine Mikrogliazelle als eher neuroprotektiv oder neurotoxisch „labeln“ kann. Ein vielversprechender Kandidat für diese Aufgabe ist das Trem-2-Protein. Dabei handelt es sich um einen Phagozytoserezeptor auf Mikrogliazellen, nach dessen Internalisation die Zelle ihre Produktion an neuroprotektiven Zytokinen hochfährt, während sie die der neurotoxischen im selben Atemzug drosselt. RNA-Expressionsstudien aus unserem Labor zeigen für Trem-2 in alten Tieren nach Schlaganfall eine deutliche Herabregulation, was auf eine verminderte neuroprotektive Kapazität der Mikroglia hindeutet. Leider schlugen zahlreiche Versuche einer immunhistochemischen Darstellung dieses Proteins fehl. Die Entwicklung eines geeigneten Antiköpers wäre somit eine wichtige Aufgabe für die Mikrogliaforschung der Zukunft.

Literaturverzeichnis

- Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. 1996. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*, 27(10):1739-1743.
- Amantea D, Giacinto B, Tassorelli C, Biagio Mercuri N, Tiziana Corasaniti M. 2010. Identification of distinct cellular pools of interleukin-1beta during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat. *Brain Research*, 1313(8): 259-269.
- Anderson GF, und Hussey PS. 2000. Population aging: a comparison among industrialized countries. *Health Affairs (Project Hope)*, 19(3):191-203.
- Assmann B. 1999. *Neurologie 294 Tabellen*. 3. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 12(6):723-725.
- Back T. 1998. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol*, 18(6):621-38.
- Baeten KM, Akassoglou K. 2011. Extracellular Matrix and Matrix Receptors in Blood-Brain Barrier Formation and Stroke. *Dev Neurobiol*, 71(11): 1018–1039.
- Baltan S, Besancon EF, Mbow B, ZuCheng Y, Hamner MA, Ransom BR. 2008. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 28(6):1479-1489.
- Bandera E, Botteri M, Minelli C, Sutton A, Abrams KR, Latronico N. 2006. Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 37(5):1334-1339.
- Bano D, Nicotera P. 2007. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 38(2):674-676.
- Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. 1997. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation* 28(6):1233-1244.
- Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW. 2002. Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 21(3):436-453.
- Belayev LO, Alonso F, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. 1996. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 27(9):1616-1622

- Beridze MZ, Urushadze IT, Shakarishvili RR. 2001. Mechanisms of delayed neuronal death in experimental acute cerebral ischemia (3):35-40.
- Berlit P. 2007. *Basiswissen Neurologie*, 5. Aufl. Heidelberg: Springer.
- Bertsch K, Hagemann D, Hermes M, Walter C, Khan R, Naumann E. 2009. Resting cerebral blood flow, attention, and aging. *Brain Research* 1267(24):77-88.
- Breckenfeld C, Schroth G, Mattle HP, Do D, Remonda L, Mordasini P, Arnold M, Nedeltchev K, Meier N, Gralla J. 2009. Stent placement in acute cerebral artery occlusion: use of a self-expandable intracranial stent for acute stroke treatment. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 40(3):847-852.
- Brinker GC, Franke, Hoehn M, Uhlenkücken U, Hossmann KA. 1999. Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay. *Neuroreport*, 10(16):3269-3272.
- Brown, David R. 2009. Role of microglia in age-related changes to the nervous system. *TheScientificWorldJournal*,9:1061-1071.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. 2006. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 31(1):149-160.
- Campuzano OM, Castillo-Ruiz M, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. 2009. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *Journal of Neuroscience Research*, 87(11):2484-2497.
- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, Li S. 2005. Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol*. 193(2):291-311.
- Carmichael, S.T. 2005 Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2(3):396-409.
- Carmo Cunha, Jinger, Freitas Azevedo Levy F, Aparecida de Luca B, Schultz M, de Andrade R, Canterucci Gomide V, Chadi G. 2007. Responses of reactive astrocytes containing S100beta protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neuroregeneration. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society and the European Tissue Repair Society*, 15(1):134-146.
- Chadi G, Fuxe K. 1998. Analysis of trophic responses in lesioned brain: focus on basic fibroblast growth factor mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,31(2):231-241.
- Chen A, Liao WP, Lu Q, Wong WSF, Wong PTH. 2007. Upregulation of

- dihydropyrimidinase-related protein 2, spectrin alpha II chain, heat shock cognate protein 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in rats--a proteomics approach. *Neurochemistry International*, 50(7):1078-1086.
- Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan P, Zhou RL, Simon RP. 1995. bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport*, 6(2):394-398.
- Chen RL, Balami JS, Esiri MM, Chen LK, Buchan AM. 2010. Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence. *Nature Reviews Neurology*, 6(5):256-265.
- Choi JH, Lee CH, Hwang IK, Won MH, Seong JK, Yoon YS, Lee HS, Lee IS. 2007. Age-related changes in ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity and protein level in the gerbil hippocampal CA1 region. *J Vet Med Sci*, 69(11):1131-6.
- Chou, Wen-Hai, Doo-Sup C, Zhang H, Mu D, McMahon T, Kharazia VN, Clifford CA, Lowell, Ferriero DM, Messing RO. 2004. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(1):49-56.
- Conde JR, Streit WJ. 2006. Microglia in the aging brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(3):199-203.
- Conde JR, Streit WJ. 2006. Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury. *Neurobiology of Aging*, 27(10):1451-1461.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 5134(29):689-695.
- Crack PJ, Taylor JM. 2005. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 38(11):1433-1444.
- Bonneh-Barkay D, Wiley CA. 2009. Brain Extracellular Matrix in Neurodegeneration *Brain Pathol*, 19(4): 573–585.
- Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z. 2005. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 36(8):1790-1795.
- Davoust N, Vauillat C, Androdias G, Nataf S. 2008. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends in Immunology*, 29(5):227-234.
- Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM. 2007. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(12):1941-1953
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2008. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. 4. Aufl. Stuttgart ;New York: Thieme.

- DiNapoli VA, Huber JD, Houser K, Li X, Rosen CL. 2008. Early disruptions of the blood-brain barrier may contribute to exacerbated neuronal damage and prolonged functional recovery following stroke in aged rats. *Neurobiology of Aging* 29(5):753-764.
- Dirnagl UC, Iadecola, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences* 22(9):391-397.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3):310-8
- Durukan A, Tatlisumak T. 2009. Animal models of ischemic stroke. *Handbook of Clinical Neurology / Edited by P.J. Vinken and G.W. Bruyn* 92:43-66.
- Durukan A, Tatlisumak T. 2009. Ischemic stroke in mice and rats. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 573: 95-114.
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. 2009. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158(3):1021-1029.
- Fabricsius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, Lauritzen M. 2006. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain: A Journal of Neurology*, 129(3):778-790.
- Farrall AJ, Wardlaw JM. 2009. Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of Aging* 30(3): 337-352.
- Faulkner JR, Herrmann J, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(9): 2143-2155.
- Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Anderson CS. 2003. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurology*, 2(1):43-53.
- Fitch MT, Silver J. 1997. Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Experimental Neurology* 148(2):587-603.
- Flanary BE, Streit WJ. 2003. Telomeres shorten with age in rat cerebellum and cortex in vivo. *Journal of Anti-Aging Medicine* 6(4):299-308.
- Flanary BE, Streit WJ. 2004. Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia*, 45(1):75-88.
- Furlan AR, Higashida, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M. 1999. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke. The PROACT II study: a randomized controlled trial. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 282(21):2003-2011.

- N Futrell, JH Garcia, E Peterson and C Millikan. 1991. Embolic stroke in aged rats. *Stroke*, 22;1582-1591.
- Gall C, Rose G, Lynch G. 1979. Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 183(3):539-549.
- Garcia JH, Liu KF, Relton JK. 1995. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *The American Journal of Pathology*, 147(5):1477-1486.
- Garden GA, Möller T. 2006. Microglia biology in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 1(2):127-137.
- Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe C, Siler DA, Arumugam TV. 2009. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 40(5):1849-1857.
- Ginsberg MD. 2003. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 34(1):214-223.
- Giulian D, Ingeman JE. 1988. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(12): 4707-4717.
- Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB. 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(2):709-714.
- Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. 2002. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 33(8):2123-2136.
- Gorio A. 1986. Spreading depression: metabolic and ionic implications. *Functional Neurology*, 1(2):203-205.
- Graber JJ, Jalbut SD. 2009. Protective autoimmunity in the nervous system. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(2):147-159.
- Graeber MB. 2010. Changing face of microglia. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005):783-788.
- Graeber MB, Streit WJ. 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1):89-105.
- Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S. 1998. Oedema and glial cell involvement in the

- aged mouse brain after permanent focal ischaemia. *Brain Res*, 813(2):241-53.
- Graham SM, McCullough LD, Murphy SJ. 2004. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 54(5):486-496.
- Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. 2000. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(1):53-65.
- Hacke W, Brott T, Caplan L, Meier D, Fieschi C, von Kummer R, Donnan G. 1999. Thrombolysis in acute ischemic stroke: controlled trials and clinical experience. *Neurology*, 53(7):3-14.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 359(13):1317-1329.
- Halliwel B. 2011. Free radicals and antioxidants -quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 1:120-124.
- Hasegawa-Ishii S, Takei S, Chiba Y, Furukawa A, Umegaki H, Iguchi A, Kawamura N, Yoshikawa K, Hosokawa M, Shimada A. 2011. Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice. *Neuropathology*, 31(1):20-8.
- Haupt C, Witte OW, Frahm C. 2007. Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury. *Mol Cell Neurosci*, 35(1):89-99.
- Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T. 2008. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(34):8624-8634.
- Heiss WD. 2010. The concept of the penumbra: can it be translated to stroke management? *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, 5(4):290-295.
- Hertz L, Dienel GA. 2002. Energy metabolism in the brain. *International Review of Neurobiology*, (51):1-102.
- Horn F. 2003. *Biochemie des Menschen : das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 2. Aufl. Stuttgart ;New York: Thieme.
- Hossmann K A. 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of Neurology*, 36(4):557-565.
- Konstantin A. 2009. Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia*

Neuropathologica, 47(3):213-227.

- Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. 2008. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neuroscience*, 28(34):8624-34.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. 2006. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*, 66(3):232-245.
- Hurn PD, Subramanian S, Afentoulis ME, Kaler L, Vandenbark AA, Offner H. 2007. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(11):1798-1805.
- Jin K, Minami M, Xie L, Sun Y, Mao X, Wang Y, Simon RP, Greenberg DA. 2004. Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell*, 3(6):373-377.
- Jin R, Yang G, Guohong L. 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(5):779-789.
- Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H. 2008. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(9):4162-4168.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4):239-257.
- Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* , 81(3):302-13.
- Kloss, C U, G W Kreutzberg, und G Raivich. 1997. Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *Journal of Neuroscience Research* 49, no. 2 (Juli 15): 248-254.
- Kolominsky PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B, Schöffski O, Krobot KJ. 2006. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 37(5):1179-1183.
- Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ. 2009. Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival. *Neurotoxicology*, 30(5):785-793.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8):312-318.

- Kriz J. 2006. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Critical Reviews in Neurobiology*, 18(1-2):145-157.
- Kulcsár Z, Bonvin C, Pereira VM, Altrichter S, Yilmaz H, Lövblad KO, Sztajzel R, und Rüfenacht DA. 2010. Penumbra system: a novel mechanical thrombectomy device for large-vessel occlusions in acute stroke. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 31(4):628-633.
- Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D. 2000. Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.*, 67(1):104-8.
- Kumar G, Kumar M, Goyal, Sahota PK, Jain R. 2010. Penumbra, the basis of neuroimaging in acute stroke treatment: current evidence. *Journal of the Neurological Sciences*, 288(1-2):13-24.
- Lai AY, Todd KG. 2005. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol*; 84(1):49-59.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10):2596-2605.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, Meldgaard F, Finsen B. 2007. Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience*, 144(3):934-949.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS. 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(5):1319-1330.
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TR. 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genetics*, 25(3):294-297.
- Lee S, Yang G, Yong Y, Liu Y, Zhao L, Xu J, Zhang X. 2010. ADAR2-dependent RNA editing of GluR2 is involved in thiamine deficiency-induced alteration of calcium dynamics. *Molecular Neurodegeneration*, 5(54):1186-1750.
- Lee SC, Liu W, Brosnan CF, Dickson DW. 1994. GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia*, 12:309–318.
- Lees, G J. 1993. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *Journal of the Neurological Sciences* 114, no. 2 (Februar): 119-122.
- Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, Diemer NH, Finsen B. 1997. Microglial and

- macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *The Journal of Comparative Neurology*, 386(3):461-476.
- Lin HW, Basu A, Druckman C, Cicchese M, Krady JK, Levison SW. 2006. Astroglialosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 3(15):145-162.
- Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, El-Hayek YH. 2006. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(20):5309-5319.
- Liu F, Yuan R, Benashski SE, McCullough LD. 2009. Changes in experimental stroke outcome across the life span. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(4):792-802.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 20(1):84-91.
- Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. 2008. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia*, 56(10):1048-1060.
- Lu T, Pan Y, Kao S, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994):883-891.
- Ly, John V, Jorge A Zavala, und Geoffrey A Donnan. 2006. Neuroprotection and thrombolysis: combination therapy in acute ischaemic stroke. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 7, no. 12 (August): 1571-1581. doi:10.1517/14656566.7.12.1571.
- Marler JR, Goldstein LB. 2003. Medicine. Stroke--tPA and the clinic. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5640):1677.
- Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, Christensen H. 2011. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 66(2):202-213.
- McCombe PA, Read SJ. 2008. *Int J Stroke*, 3(4):254-65.
- Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JA. 2000. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(1):435-441.
- Mhairi MI. 1992. New models of focal cerebral ischaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 34(4): 302-308.
- Mori E, Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE. 1992. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal

- cerebral ischemia in baboons. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 23(5):712-718.
- Nakajima K, Kohsaka S. 2004. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders*, 4(1):65-84.
- Nakanishi H, Wu Z. 2009. Microglia-aging: roles of microglial lysosome- and mitochondria-derived reactive oxygen species in brain aging. *Behavioural Brain Research*, 201(1):1-7.
- Nandini CD, Sugahara K. 2006. Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Advances in Pharmacology*, 53:253-279
- Ness JK, Wood TL. 2002. Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 20(3):476-488.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM. 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(2):288-295.
- Neumann H, Takahashi K. 2007. Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *Journal of Neuroimmunology*, 184(1-2):92-99.
- Neumann J, Sauerzweig S, Röncke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, Gunzer M, Reymann KG. 2008. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(23):5965-5975.
- Njie EG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HW, Borchelt DR, Streit WJ. 2010. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*, [Epub ahead of print]
- Nolte, C.H., G.J. Jungenhülsing, Villringer A. 2002. Durchblutungsmangel setzt Kaskade der Zerstörung in Gang. *Neurotransmitter*, 1: 2-5.
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4):844-856.
- Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. 2009. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities. *European Neurology*, 61(6):321-330.
- Palm F, Urbanek C, Rose S, Buggle F, Bode B, Hennerici MG, Schmieder K, Inselmann G, Reiter R, Fleischer R, Piplack KO, Safer A, Becher H, Grau AJ. 2010. *Stroke*, 41(9):1865-70.

- Perry VH, Matyszak MK, Fearn S. 1993. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*, 7(1):60-7.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. 2006. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3):223-36.
- Petcu EB, Sfredel V, Platt D, Herndon JG, Kessler C, Popa-Wagner A. 2008. Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: a mini-review. *Gerontology*, 54(1):6-17.
- Poeck K. 2001. *Neurologie : mit 70 Tabellen*. 11. Aufl. Berlin: Springer.
- Polazzi E, Monti B. 2010. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Progress in Neurobiology*, 92(3):293-315.
- Popa-Wagner A, Badan I, Vintilescu R, Walker L, Kessler C. 2006. Premature cellular proliferation following cortical infarct in aged rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 47(3):215-228.
- Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, Kessler C. 2007. Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathologica*, 113(3):277-293.
- Rhodes KE, Moon LDF, Fawcett JW. 2003. Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience*, 120(1):41-56.
- Relton J.K., Martin D. 1996. Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Experimental Neurology*, 138 (2): 206-213.
- Rio-Hortega P. 1921. Estudio sobre la neuroglia. La glia de escasas radiaciones. *Boletín de la Sociedad de española histologica*, 21:64-91.
- Rolls A, Shechter R, London A, Segev Y, Hirsch JJ, Amariglio N, Gidon Rechavi, Schwartz M. 2008. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. *PLoS Medicine*, 5(8):210-220.
- Rolls A, Shechter R, Schwartz M. 2009. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(3):235-241.
- Rosen CL, Dinapoli VA, Nagamine T, Crocco T. 2005. Influence of age on stroke outcome following transient focal ischemia. *Journal of Neurosurgery*: 103(4) 687-694.
- Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Redgrave JNE. 2005. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and

- mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet*, 366(9499):1773-1783.
- Ruocco AON, Docagne F, Ali C, Chazalviel L, Komesli S, Yablonsky F. 1999. A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(12):1345-1353.
- Gorres S, Meier-Baumgartner HP. 1993. The epidemiology of stroke. *Zeitschrift für Gerontologie*, 26(6):482-93.
- Sawada M, Sawada H, Nagatsu T. 2008. Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neuro-Degenerative Diseases*, 5(3-4):254-256.
- Scavone C, Munhoz CD, Kawamoto EM, Glezer I, de Sá Lima L, Marcourakis T, Pekelmann Markus R. 2005. Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na,K-ATPase activity. *Neurobiology of Aging*, 26(6):907-916.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, 183(1):25-33.
- Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R. 2005. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, 196(2):290-297.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3):311-322.
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. 1994. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroimmunology*, 55(2):195-203.
- Schwab ME. 2004. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 14: 118–24.
- Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, Roca J, Cascante M. 2011. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS Comput Biol*, 7(3):e1001115
- Shah GN, Mooradian AD. 1997. Age-related changes in the blood-brain barrier. *Experimental Gerontology*, 32(4-5):501-519.
- Sieber MW, Claus RA, Witte OW, Frahm C. 2011. Attenuated inflammatory response

- in aged mice brains following stroke. *PLoS One*.6(10):e26288
- Silver J, Miller JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(2):146-156.
- Simon RP. 2006. Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Archives of Neurology*, 63(10):1368-1371.
- Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP. 2002. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 932(1-2):110-119.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology*, 52(2):149-171.
- Streit WJ. 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends in Neurosciences*, 29(9):506-510.
- Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. 2009. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(4):475-485.
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, 45(2):208-212.
- Streit WJ, Xue QS. 2009. Life and death of microglia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4(4):371-379.
- Stroebele N, Müller-Riemenschneider F, Nolte CH, Müller-Nordhorn J, Bockelbrink A, Willich SN. 2011. Knowledge of risk factors, and warning signs of stroke: a systematic review from a gender perspective. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, 6(1):60-66.
- Stuesse SL, Cruce WL, Lovell JA, McBurney DL, Crisp T. 2000. Microglial proliferation in the spinal cord of aged rats with a sciatic nerve injury. *Neurosci Lett.* ;287(2):121-4.
- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current Molecular Medicine*, 4(2):193-205.
- Takahiro T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. 2009. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 40(3):8-12.
- Takizawa SMH, Hakim AM. 1991. The effects of a competitive NMDA receptor antagonist (CGS-19755) on cerebral blood flow and pH in focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11(5):786-793.
- Tanaka A, Watanabe Y, Kato H, Araki T. 2006. Immunohistochemical changes

- related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. *Mech Ageing Dev*, 28(4):303-10.
- Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita T, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T. 2003. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience*, 117(3):531-539.
- Tomsick T, Broderick J, Carrozella J, Khatri P, Hill M, Palesch Y, Khoury J. 2008. Revascularization results in the Interventional Management of Stroke II trial. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 29(3):582-587.
- Trendelenburg G, Dirnagl U. 2005. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*, 50(4):307-320.
- Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M, Piccio L, Hernandez M, Colonna M. 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(6):3520-3524.
- United Nations. 2008. World Population Prospects. The 2008 Revision. p(X)
- Vaughan DW, Peters A. 1974. Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. *Journal of Neurocytology*, 3(4):405-429.
- Vijayan VK, Cotman CW. 1983. Lysosomal enzyme changes in young and aged control and entorhinal-lesioned rats. *Neurobiology of Aging*, 4(1):13-23.
- Walz W, Wuttke WA. 1999. Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. *Journal of Neuroscience Research*, 56(6):595-603.
- Wang Z., Yue T. 1995. Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 15:166-171.
- Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC. 2008. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. *The European Journal of Neuroscience*, 28(7):1316-1328.
- Wie YH, Lu CU, Wie CY, Ma YS, Lee HC. 2001. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *The Chinese Journal of Physiology*, 44(1):1-11.
- White RE, Qin Yin F, Jakeman LB. 2008. TGF- α increases astrocyte invasion and promotes axonal growth into the lesion following spinal cord injury in mice. *Experimental Neurology*, 214(1):10-24.
- Wood PL. 1995. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurological Research*, 17(4):242-248.

- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. 2010. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*, 11(2):174-183.
- Zaremba J, Skrobanski P, Losy J. 2001. Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 55(5):258-263.
- Zhao C, Li W, Franklin RJM. 2006. Differences in the early inflammatory responses to toxin-induced demyelination are associated with the age-related decline in CNS remyelination. *Neurobiology of Aging*, 27(9):1298-1307.

Anhang

Puffer und Chemikalien

PBS

Stocklösung-1

42,6 g Na_2HPO_4 (Merck)

238.4 g NaCl (Roth)

3000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Stocklösung-2

13.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

79.5 g NaCl (Roth)

1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Herstellung Puffer

1400 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

35 ml Stock II

mit ca. 160 ml Stocklösung-1 pH 7.4 einstellen

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 2000 ml auffüllen

4% PFA

0.2 M Phosphatpuffer

Stocklösung-1

28.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Stocklösung-2

8.3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)

300 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Herstellung Puffer

Stocklösung-1 mit Stocklösung-2
auf pH=4 titrieren

Herstellung 4% PFA

40 g PFA (Riedel-De Häen)

300 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

6-8 Tropfen 10 M NaOH (Roth)

500 ml 0.2 M Phosphatpuffer

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 l auffüllen

30% Saccharose

30 g Saccharose (Roth)

100 ml PBS pH 7.4

Anti-Freeze-Lösung**Phosphatpuffer****Stocklösung-1**

42.6 g Na_2HPO_4 (MERCK)

3000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Stocklösung-2

13.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MERCK)

1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Herstellung Puffer

700 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

17.5 ml Stocklösung-2

mit 26-30 ml Stocklösung-1 pH auf 7.4 einstellen

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 l auffüllen

Herstellung Anti-Freeze

150 g Glukose (Roth)
300 ml Ethylenglykol (Fluka)
200 mg Natriumazid (Merck)
500 ml Phosphatpuffer pH 7.4

TBS

132.2 g TRIS-HCl (Roth)
19.4 TRIS-Base (Roth)
90 g NaCl
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1l

TBS-T

2ml Triton(Merck)
mit TBS auf 1L

NDS

Normal-Donkey-Serum (Millipore)

10mM Citratpuffer

2,94g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{Na}$ (Fluka)
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 l auffüllen
mit NaOH auf pH=6 einstellen

Antikörper	Verdünnung	Firma und Bestellnummer
Primäre		
Monoclonal rat anti mouse-CD68	1:1000	Serotec MCA 1957
Polyclonal goat anti mouse-Iba1	1:200	Abcam ab 5076
Polyclonal rabbit anti mouse-Ki67	1:500	Novacastra NCL-Ki67p
Sekundäre		
Rhodamin donkey anti-rat	1:1000	Dianova 712-295-150
Alexa Flur-488 donkey anti-goat	1:500	Invitrogen A-11055
Cy5 donkey anti-rabbit	1:500	Dianova 706-296-148

Tab.:1 primäre und sekundäre Antikörper

Kupfer(II)-sulfat-Lipofuscinblocklösung

50mM Acetatpuffer

Stocklösung1

11,55ml $C_2H_4O_2$ (Merck)

1000 ml H_2O_{dest}

Stocklösung-2

27.2 g $C_2H_3NaO_2$ (Merck)

1000 ml H_2O_{dest}

Herstellung Puffer

74ml Stocklösung-1 und 176ml Stocklösung-2

mit H_2O_{dest} auf 1L auffüllen

Herstellung Blocklösung

249mg CuSO₄ (Sigma)

in 100ml 50mM Acetatpuffer lösen

mit Essigsäure(Roth) auf pH=5 einstellen

Gelatine

1g Gelatine (Merck)

0.1 g Chrom(III)-Kaliumsulfat 12 H₂O (Merck)

200 ml H₂O₂ dest

10 min quellen lassen, langsam auf 40°C erwärmen, filtrieren

Mowiol

10 g Mowiol 4-88 (Calbiochem)

10 g Mowiol 40-88 (Aldrich)

200 ml PBS

100 ml Glyzerol (Roth)

300 mg DAPCO (Diazabicyclo-Octane; Sigma)

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Sonthofen 19.12.2012

Robert Zünder

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. O.W. Witte für die freundliche Überlassung des Themas und dafür, dass ich sein Labor nutzen konnte.

Dr. Christiane Frahm und Matthias Sieber danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und Unterstützungen die ich von ihnen im Laufe meiner Arbeit erfahren habe.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich den technischen Assistentinnen meiner Arbeitsgruppe Madlen Günther und Diana Freitag für die Durchführung der MCAO und nachfolgender Präparationsschritte sowie für die vielen kleinen und großen Hilfestellungen im Laboralltag.

Den restlichen Mitgliedern der AG-Frahm mit Anna Stahr, Anke Popp, Nadine Jänisch und Marcus Böhme danke ich ebenfalls für die netten Gespräche und ihre Unterstützung.

Einen Dank auch an meine Freunde und meine WG für die schöne Zeit in Jena.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung in all diesen Jahren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Robert Zünder
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdaten:	19. Januar 1985 in Greiz

Schulische Ausbildung

1991 – 1995	Grundschule Bertolt Brecht, Greiz
1995 – 2003	Pestalozzi Gymnasium, Greiz

Studium

2003 – 2010	Studium der Humanmedizin, Friedrich Schiller Universität Jena
08/2005	Bestehen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
02/2009 – 01/2010	Praktisches Jahr
06/2010	Bestehen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
07/2010	Approbation als Arzt

Promotion

seit 08/2008	Promotion, Thema: „altersabgängige Mikrogliaaktivierung und Proliferation nach Schlaganfall“, experimentelle Neurologie, Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena
--------------	---

Berufstätigkeit

seit 06/2011	Assistenzarzt für Innere Medizin/Kardiologie an den Kliniken Oberallgäu, Standort Immenstadt/ Herz und Gefäßzentrum Oberallgäu-Kempten
--------------	--